

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Buněčná a vývojová biologie



Bc. Štěpánka Tučková

Vliv NADPH oxidázy na architekturu a funkci β buněk a Langerhansových ostrůvků
The role of NADPH oxidase in architecture and function of β cells and Langerhans Islets

Diplomová práce

Vedoucí práce: RNDr. Lydie Plecítá, Ph.D.

Praha, 2020

Poděkování:

Děkuji své školitelce RNDr. Lydii Plecité, Ph.D. za odborné vedení této diplomové práce, za praktickou i teoretickou pomoc při její realizaci, trpělivost a psychickou podporu. Děkuji také za její přátelský přístup a ochotu.

Ráda bych také poděkovala Mgr. Blance Holendové, Ph.D. za odbornou pomoc s pokusnými zvířaty, trpělivost a cenné rady.

Děkuji RNDr. Alžbětě Vojtíškové a jejím kolegům z IKEM za možnost práce v histologické laboratoři IKEM a poskytnutá doporučení ohledně práce s histologickými preparáty.

Děkuji také dalším členům oddělení, kteří přispěli radou či odbornou pomocí, zejména Mgr. Vojtěchu Pavluchovi a Janě Vaicové.

Děkuji také všem ostatním, rodině a přátelům, kteří mi pomohli v průběhu studia a podporovali mě při psaní této diplomové práce.

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 3. června 2020

Podpis:

Abstrakt

Lokální produkce reaktivních forem kyslíku (ROS, z angl. *reactive oxygen species*) a změny v oxidačně-redukčním prostředí mají vliv na metabolismus a funkci β buněk Langerhansových ostrůvků (LO). Změna poměru mezi redoxními partnery NAD(P)H/NAD(P)⁺ významně ovlivňuje citlivé proteiny a tvorbu ROS. ROS jsou schopné reversibilně modifikovat některé aminokyselinové zbytky (např. Cys, Met) antioxidantních enzymů a jejich interakčních partnerů. Takováto signální kaskáda umožňuje přenos signálu na delší vzdálenosti a může zasahovat i do ovlivnění genové exprese. Unikátní enzym NADPH oxidáza 4 (NOX4) je přítomen na membránách uvnitř β buněk a konstitutivně vytváří H₂O₂ na základě přítomnosti NAD(P)H. Po stimulaci glukózou stoupá hladina NAD(P)H i exprese genu *Nox4*. Jak bylo již dříve zjištěno v naší laboratoři, myši C57BL/6J se specifickou delecí *Nox4* v β buňkách (MUT, z angl. *mutant*) mají porušen dvoufázový výlev inzulínu a vykazují inzulinovou rezistenci v tuku a svalové tkáni. Zjistili jsme, že absence NOX4 má vliv na architekturu LO. Kontrolní (WT, z angl. *wild type*) myši na normální převážně sacharidové stravě (ND, z angl. *normal diet*) mají nejvíce drobných LO o ploše do 5 000 μm^2 (měřeno na histologických řezech). Vysokotuková strava (HFD, z angl. *high fat diet*) u WT po 8 týdnech vede k rozvoji diabetického fenotypu a hypertrofii LO (LO > 5 000 μm^2). U MUT myší pozorujeme hypertrofii LO již na ND. Absence NOX4 u nich současně zabraňuje negativnímu působení HFD na dalším rozvoji hypertrofie LO. Stejné výsledky jsme zaznamenali u dospělých i mladých čtyřtýdenních myší. Snížení exprese *Nox4* u INS-1E β buněk pomocí siRNA vedlo i při nízkých hladinách glukózy (2,5 mM glukóza/ 1 hodina) ke zvýšené bazální tvorbě proinzulinu, nikoliv však zralého inzulínu. Snížení exprese *Nox4* pomocí siRNA zvyšuje u INS-1E buněk hladinu mRNA transkripčního faktoru pankreatického duodenálního homeobox proteinu 1 (PDX1). Nezaznamenali jsme výrazné ovlivnění hladin mRNA dalšího transkripčního faktoru *Musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homologu A* (MAFA), mRNA inzulinového genu 1 a enzymů sestřihu proinzulinu na inzulin prohormon konvertázy 1 (PC1), proprotein konvertázy 2 (PC2) a karboxypeptidázy E (CPE). Na základě našich poznatků přisuzujeme ROS pocházejícím z aktivní NOX4 důležitou signální roli ve správné funkci β buněk a celých Langerhansových ostrůvků. Snížení hladiny NOX4 v β buňkách vede na buněčné úrovni k narušení GSIS, ovlivňuje genovou expresi a úplná absence u hlodavců způsobuje nárůst velikosti LO.

Klíčová slova:

NADPH oxidáza, NOX4, β buňky, diabetes, redoxní signalizace, Langerhansovy ostrůvky, reaktivní formy kyslíku

Abstract

Local production of reactive oxygen species (ROS) and changes in the redox environment influence the metabolism and function of β cells of the Langerhans islets (LO). Changing the ratio between NAD(P)H / NAD(P)⁺ redox partners significantly affects sensitive proteins and ROS production. ROS are able to reversibly modify some amino acid residues (eg Cys, Met) of antioxidant enzymes and their interaction partners. Such a signaling cascade allows the transmission of a signal over longer distances and can also interfere with the influence of gene expression. The unique enzyme NADPH oxidase 4 (NOX4) is present on membranes within β cells and constitutively produces H₂O₂ depending on the presence of NAD(P)H. After glucose stimulation, both NAD(P)H and *Nox4* mRNA levels increase. As previously observed in our laboratory, C57BL/6J mice with a specific *Nox4* deletion in β cells have a disrupted biphasic insulin release and exhibit insulin resistance in fat and muscle tissue. We found that the absence of NOX4 in C57BL/6J mice affects LO architecture. Wildtype (WT) mice on a normal, predominantly carbohydrate diet (ND) have the majority of small LO with an area of up to 5 000 μm^2 (measured on histological sections). High-fat diet (HFD) feeding of WT for 8 weeks leads to the development of diabetic phenotype and an increase in LO hypertrophy (LO > 5 000 μm^2). The specific deletion of *Nox4* in β cells in mice causes LO hypertrophy already on ND. At the same time, it prevents the negative effect of HFD on the further amplification of LO hypertrophy. The same results were seen in both adult and young four-week-old mice. Reduction of *Nox4* gene expression in INS-1E β cells by siRNA resulted in increased basal proinsulin production already at low glucose levels (2.5 mM glucose /1 hour). Suppressed production of NOX4 by siRNA increases the mRNA level of the transcriptional factor pancreatic duodenal homeobox protein 1 (PDX1) in the INS-1E cells. There was no significant effect on the mRNA level of another transcription factor of insulin musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog A (MAFA) and proinsulin to insulin splicing enzymes prohormone convertase 1 (PC1) and proprotein convertase 2 (PC2) and carboxypeptidase E (CPE). Based on our findings, ROS derived from active NOX4 have an important signaling role in the correct physiological function of β cells and whole islets of Langerhans. The reduction of NOX4 in β cells leads to disruption of GSIS at the cellular level, affects gene expression and its absence causes LO hypertrophy increase in rodents.

Key words:

NADPH oxidase, NOX4, β cells, diabetes, redox signaling, Langerhans islets, reactive oxygen species

Seznam užitých zkratk

<u>Zkratka</u>	<u>Význam</u>
ADP	adenosindifosfát
AK	aminokyselina
AP1	aktivátorový protein 1, heterodimer Fox a Jun proteinu
ARE	element antioxidační odpovědi, z angl. <i>antioxidant response element</i>
ATB	antibiotika
ATP	adenosintrifosfát
AVČR	Akademie věd České republiky
BCA	bicinchoninová kyselina
BIOCEV	Biotechnologické a biomedicínské centrum Akademie věd a Univerzity Karlovy ve Vestci
BSA	hovězí sérový albumin
C57BL/6J	laboratorní kmen <i>Mus musculus</i> C57 black 6, The Jackson laboratory, USA
CoA	koenzym A
CPE	karboxypeptidáza E (protein, <i>Cpe</i> – gen)
DM	<i>diabetes mellitus</i> , cukrovka
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DUOX	duální oxidázy (protein, <i>Duox</i> – gen)
EGF	epidermální růstový faktor, z angl. <i>epidermal growth factor</i>
ELISA	imunologická metoda sloužící ke stanovení koncentrace/detekce proteinu, angl. <i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i>
ER	endoplazmatické retikulum
ERK	kinázy regulované extracelulárním signálem, z angl. <i>extracellular signal-regulated kinases</i>
ERO1	oxidoreduktin 1 endoplazmatického retikula
ETC	elektron transportní řetězec, z angl. <i>electron transport chain</i>
FAD ⁺ /FADH ₂	flavinadenindinukleotid, oxidovaná/ redukována forma
G6PDH	glukóza-6-fosfát dehydrogenáza
GA3PDH	glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáza

GATA6	GATA vazebný faktor 6, z angl. <i>GATA binding factor 6</i>
GIP	gastrický inhibiční peptid
GK	glukokináza (hexokináza IV)
GLP	glukagonu podobný peptid, z angl. <i>glucagon like peptide</i>
GLUT2	glukózový transportér 2
GPR40	s G proteiny spojený receptor 40
GPx	glutathion peroxidáza
GRX	glutaredoxin
GSIS	glukózou stimulovaná inzulinová sekrece
GSH (GSSG)	glutathion redukovaný (oxidovaný glutathion ve formě glutathion disulfidu)
GSHRd	glutathion reduktáza
<i>hIns</i>	gen lidského inzulinu
ChREBP	vazebný protein závislý na karbohydrátech, z angl. <i>carbohydrate-responsive element-binding protein</i>
IDH	izocitrát dehydrogenáza
IFN γ	interferon gamma
IL1 β	interleukin 1 beta
INS-1E	kryší nesmrtná β buněčná linie, <i>Insulinoma cell line, Rattus norvegicus</i> (RRID:CVCL_0351)
IP $_3$ R	inositol trifosfátový receptor
IR	inzulinový receptor
IRS2	substrát inzulinového receptoru 2
ISL1	enhancer protein inzulinového genu 1, z angl. <i>Insulin gene enhancer protein 1</i>
LO	Langerhansův ostrůvek
MAFA	<i>Musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog A</i> , nebo také <i>RIPE3 element binding protein 1</i> (protein, <i>MafA</i> – gen)
MAMs	s mitochondriemi asociované membrány, z angl. <i>mitochondrial associated membranes</i>
MAPK	mitogeny aktivované protein kinázy
MCF	regulační a výkonné faktory metabolismu, z angl. <i>metabolic coupling factors</i>
ME1	malát dehydrogenáza 1, z angl. <i>malic enzyme 1</i>
miRNA	mikro ribonukleová kyselina (RNA)

MODY	forma dědičného diabetu projevující se v dospělosti, z angl. <i>maturity onset diabetes of young</i>
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina, z angl. <i>messenger ribonucleic acid</i>
MUT	mutantní myš se specifickou delecí <i>Nox4</i> v β buňkách vytvořená na pozadí myši C57BL/6J, β <i>NOX4</i> ^{-/-}
NAD(P) ⁺ /NAD(P)H	nikotinamidadeninukleotid(fosfát), oxidovaná/redukována forma
NEB	pulmonární neuroepiteliální tělíska plic, z angl. <i>pulmonary neuroepithelial bodies</i>
NEUROD1	transkripční faktor neuronální diferenciace 1, známý také jako β buněčný E-Box transaktivátor 2
NF κ B	nukleární faktor kappa B
NKX	transkripční faktor, z angl. <i>NK homeobox protein</i>
NNT	NAD(P) transhydrogenáza
NOX	NADPH oxidázy (protein, <i>Nox</i> gen)
NOX4	NADPH oxidáza 4 (protein, <i>Nox4</i> gen), jinak také zvaná Renox, z angl. <i>renal oxidase</i>
OVER	skupina INS-1E buněk s overexprimovanou <i>Nox4</i>
P	hladina statistické významnosti
PAX4/6	transkripční faktor, z angl. <i>Paired box 4/6</i>
PC1	Prohormon konvertáza 1 (protein, <i>Pc1</i> – gen)
PC2	Proprotein konvertáza 2 (protein, <i>Pc2</i> – gen)
PDGF	růstový faktor krevních destiček, z angl. <i>platelet derived growth factor</i>
PDI	protein disulfid izomeráza
PDX1	transkripční faktor pankreatický a duodenální homeobox protein 1 (protein, <i>Pdx1</i> – gen)
PI ₃ K	fosfatidylinositol-3-kináza
PKA	proteinkináza A
PKB	proteinkináza B, jinak zvaná také Akt
PKC	proteinkináza C
PLAZ	skupina buněk INS-1E vystavena „prázdnému“ plazmidu sloužící jako negativní kontrola k overexpresi <i>Nox4</i>
PP	pankreatický polypeptid
Prdx	peroxiredoxin
PTB	vazebný protein, z angl. <i>polypyrimidin tract-binding protein</i>
PTP	protein tyrozin fosfatázy
<i>rIns1</i>	potkaní gen inzulinu 1

<i>rIns2</i>	potkaní gen inzulinu 2
ROS	reaktivní formy kyslíku, z angl. <i>reactive oxygen species</i>
RT	pokožová teplota, z angl. <i>room temperature</i>
RT-PCR	polymerázová řetězcová reakce (PCR) spojená s reverzní transkripcí
RyR2	ryanodinový receptor 2
SCR	kontrolní skupina INS-1E β buněk vystavená chemikáliím a nekódující siRNA sekvenci, tzv. <i>scramble</i> , k ověření specifity siRNA a „silencingu“
SERCA	sarkoplazmatická Ca^{2+} ATPáza
SiNOX4	skupina INS-1E β buněk vystavená siRNA ke snížení hladiny NOX4 v buňce („silencing“)
SOD	superoxid dismutáza
Srx	sulfiredoxin
SiRNA	malá interferující RNA, z angl., <i>small interfering RNA</i>
T1DM	cukrovka 1. typu, z angl. <i>type 1 diabetes mellitus</i>
T2DM	cukrovka 2. typu, z angl. <i>type 2 diabetes mellitus</i>
TGF β -1	transformující růstový faktor beta 1, z angl. <i>transforming growth factor beta 1</i>
TNF α	tumor-nekrotizující faktor alfa
TRPM2	teplotně senzitivní Ca^{2+} kanál 2, z angl. <i>transient receptor potential melastatin 2</i>
TRX	thioredoxin
TRXNIP	thioredoxin interreagující protein
TRXRd	thioredoxin reduktáza
UCP2	rozpřahovací protein 2, z angl. <i>uncoupling protein 2</i>
UPR	dráha odpovědi na nesložené proteiny v ER, z angl. <i>unfolded protein response</i>
VRAC	objemem buňky regulovaný aniontový kanál, z angl. <i>volume-regulated anion channel</i>
WT	kontrolní myš (z angl., <i>wild type</i>) C57BL/6J, β NOX4 ^{+/+}

Obsah

Seznam užitych zkratk	1
1. Úvod	7
2. Literární přehled	8
2.1 Langerhansův ostrůvek	8
2.1.1 Stavba zdravého LO a její mezidruhové rozdíly	8
2.1.2 Vliv stárnutí na LO	9
2.1.3 Vliv diabetu II. Typu na LO	9
2.1.4 Vliv stravy na LO	10
2.2 β buňky	11
2.2.1 Charakteristika a hlavní funkce	11
2.2.2 Adaptace a zrání/maturace β buněk	12
2.2.3 Subpopulace β buněk	13
2.3 Inzulin	13
2.3.1 Základní transkripční faktory	13
2.3.2 Vliv dlouhodobé hyperglykémie a ROS na transkripční faktory	14
2.3.3 Maturace inzulinu a exocytóza váčků	15
2.3.4 Cílové tkáně a účinky inzulinu	16
2.4 Redoxní homeostáza β buněk	16
2.5 Zdroje ROS	20
2.5.1 Mitochondrie	20
2.5.2 Endoplazmatické retikulum	21
2.5.3 Peroxizomy	22
2.5.4 S mitochondriemi asociované membrány (MAMs, z angl. <i>mitochondrial associated membranes</i>)	22
2.5.5 NADPH oxidázy (NOX)	24
2.6 Základní cesty antioxidace	27
2.7 Signalizační role ROS ve vývoji, zrání a funkci β buněk	29
2.8 Glukotoxicity a glukolipotoxicity	30
2.8.1 Glukolipotoxicity	31
2.8.2 Glukotoxicity	31
3. Seznam chemikálií a roztoků	32
4. Použité přístroje	35
5. Metodiky	36
Práce s buněčnou linií INS1E – charakteristika	36
Transfekce plazmidem s myším NOX4 či kontrolním RC3300	36
Silencing siRNA (SiNOX4) a kontrola scramble (SCR)	36
Myši C57BL6/J (WT) a β buněčně-specifický KO NOX4-/- model (MUT)	37

Izolace myších slinivек pro histochemii	37
Příprava histologického preparátu – barvení Eosinem a Hematoxylinem	37
Stanovení velikosti LO.....	38
Fixace INS-1E buněk a imunocytochemie	38
Izolace RNA pomocí Rneasy Mini Kit, Qiagen.....	38
Ošetření RNA, přepis do cDNA a RT-PCR	39
Rat insulin High Sensitivity ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) na měření množství inzulinu a proinzulinu	39
Stanovení množství proteinů v INS1E buňkách BCA metodou.....	40
SDS elektroforéza a Western blot	40
Overexprese NOX4 po stimulaci glukózou	41
Analýza výsledků a statistika	42
6. Cíle práce	43
7. Výsledky.....	45
Vliv glukózy na expresi genu <i>Nox4</i> v INS-1E β buňkách	45
Ověření úspěšnosti silencingu a overexprese <i>Nox4</i> v INS-1E β buňkách	46
Expresní analýza inzulinu, jakožto hlavní molekuly funkce β buňky.....	48
Vliv NOX4 na architekturu – počet a velikost Langerhansových ostrůvků	56
Vliv NOX4 na expresi glukagonu a inzulinu v INS-1E buňkách.....	62
8. Diskuze.....	65
Vliv glukózy na expresi <i>Nox4</i> v INS-1E β buňkách.....	65
Analýza obsahu <i>Nox4</i> mRNA a proteinu NOX4	66
Změny v genové expresi genů inzulinu a jeho základních transkripčních faktorů	67
Vliv narušení redoxní rovnováhy na obsah proinzulinu, inzulinu a jeho výlev	69
Počet LO a rozložení ve slinivce.....	70
Rozdíly architektury LO u dospělých kontrolních a mutantních myší na normální dietě (ND) a vysokotukové dietě (HFD).....	71
Rozdíly architektury LO u čtyřtýdenních kontrolních a mutantních myší matek krmených normální (ND) a vysokotukovou (HFD) dietou.....	72
Vliv NOX4 na expresi glukagonu u INS-1E buněk	73
9. Závěr	75
10. Citovaná literatura	77

1. Úvod

Pro zdraví organismu je důležité udržovat stálou a bezpečnou hladinu glykémie. Její hodnotu řídí zejména hormon inzulin vytvářený β buňkami Langerhansových ostrůvků (LO) slinivky břišní. Pokud dojde k jejich destrukci či poruše správné funkce, jedince postihne nevratně onemocnění cukrovka, *diabetes mellitus* (DM), které je celosvětově jednou z deseti nejčastějších příčin úmrtí (WHO, 2018). Provází ho viditelné morfologické změny, jako jsou hyperplázie β buněk a hypertrofie LO.

Pozitivní vliv na správnou funkci β buněk má vnitřní redoxní prostředí a reaktivní formy kyslíku (ROS, z angl. *reactive oxygen species*), které však v případě narušení redoxní rovnováhy naopak provází rozvoj onemocnění. ROS vznikají přirozeně v buněčném metabolismu a patří k hlavním regulačním a výkonným faktorům (MCF) v β buňkách. Mezi jejich nejdůležitější zdroje se ve většině eukaryotických buněk řadí komplexy I a III dýchacího řetězce na vnitřní mitochondriální membráně. Naše pozornost se však ubírá směrem k proteinům, jejichž hlavní úlohou v β buňce je cílená tvorba ROS jako signální molekuly v odpovědi na glukózu a další podněty (např. cytokiny). Jde o zástupce rodiny nikotinamidadenindinukleotidfosfát (NADPH) oxidáz (NOX, konkrétně NOX2, NOX1 a NOX4), kteří se vyskytují v membránách mitochondrií, endoplazmatického retikula (ER), jádra a také na cytoplazmatické membráně buněk (Uchizono et al., 2006; Newshome et al., 2009; Wang et al., 2018). Jejich lokální produkce ROS přímo ovlivňuje blízké redoxně-senzitivní proteiny, včetně důležitých kináz účastnících se signálních kaskád. Při nadměrné stimulaci či zvýšené genové expresi mohou NOX přímo ovlivnit schopnost buněk reagovat na oscilace glykémie v krvi. β buňky navíc exprimují nízké množství antioxidačních enzymů, což poukazuje na potenciální regulační funkci ROS v β buňkách (Grankvist et al., 1981). Naopak pokročilá cukrovka je spojována s porušením redoxní homeostázy a se zvýšeným oxidačním stresem, který dále umocňuje patologii.

V našem výzkumu se věnujeme studiu jediné konstitutivně aktivní izoformy NOX4. Její tvorbu ROS ovlivňuje pouze přítomnost substrátu (NAD(P)H) a celková hladina enzymu v buňce. V této diplomové práci jsem se zaměřila na studium vlivu absence či snížené hladiny NOX4. V jejím důsledku dojde k narušení přirozeného redoxního prostředí u potkaních β buněk kultury INS-1E a ovlivnění jejich schopnost vytvářet a vylučovat inzulin na popud glukózy. Současně jsem u těchto buněk sledovala změny v hladinách mediátorové ribonukleové kyseliny (mRNA, z angl. *messenger ribonucleic acid*) transkripčních faktorů ovlivňujících expresi inzulinu: pankreatického duodenálního homeobox proteinu 1 (PDX1), musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogen homologu A (MAFA) a enzymů účastnících se jeho sestřihu z proinzulinu na maturovanou molekulu inzulinu: prohormon konvertázy 1 (PC1) a proprotein konvertázy 2 (PC2) a karboxypeptidázy E (CPE). Simultánně jsem pozorovala změny v architektuře LO u myši se specifickou delecí genu *Nox4* v β buňkách vytvořených na pozadí kmene myši C57BL/6J (MUT, z angl. *mutant*) v porovnání se zdravou kontrolou WT (z angl. *wildtype*).

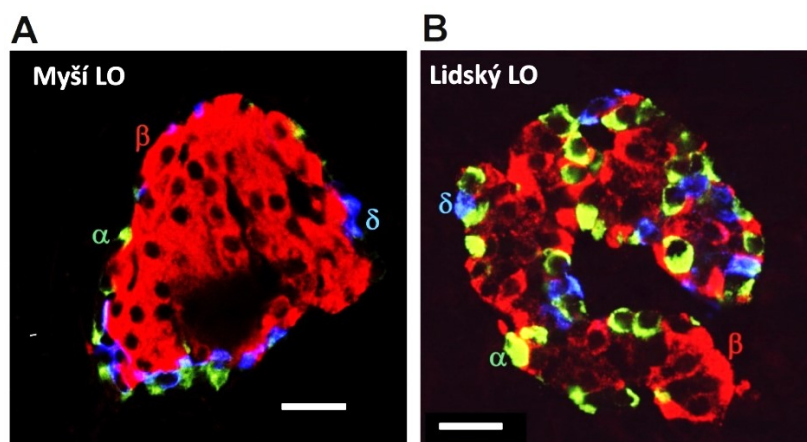
Vytvořila jsem několik skupin pokusných zvířat na základě věku a složení stravy, kdy na vysokotuková strava (HFD, z angl. *high fat diet*) měla navozovat rozvoj diabetického fenotypu. Sledovala jsem u nich rozdíly v rozvoji hypertrofie LO a velikostním rozložením a celkovém počtu LO. Ověřila jsem naši hypotézu, zda ROS produkované NOX4 ovlivňují správnou funkci β buňky, její genovou expresi a architekturu LO myši.

2. Literární přehled

2.1 Langerhansův ostrůvek

2.1.1 Stavba zdravého LO a její mezidruhové rozdíly

Uvnitř většinové exokrinní tkáně slinivky leží roztroušené jednotlivé LO. Jsou tvořeny zejména endokrinními buňkami (α , β , δ , ϵ a PP) obklopenými dobře vyvinutým cévním zásobením. Jejich poměrové zastoupení a prostorové uspořádání v LO je vysoce variabilní a liší se i mezi příslušníky stejného druhu (Kim et al., 2010). Nejčastějšími modelovými organismy ke studiu LO a DM jsou zástupci hlodavců: myši (*Mus musculus*) a potkani (*Rattus norvegicus*). Používaným pokusným organismem jsou v naší laboratoři myši kmene C57BL/6J (*The Jackson laboratory*, USA). Jejich LO jsou kompaktní s jádrem tvořeným převážně β buňkami, které tvoří zhruba 70-90 % LO a obklopují je ostatní endokrinní buňky α (8-25 %), δ , ϵ a PP (Marhfour et al., 2009; Folli et al., 2018). Lidské LO tvoří také zejména β buňky (70-80 %), zachovávají si ovšem kontakty s ostatními buněčnými typy. Neshlukují se v centrální homogenní klastry, jak je vidět obrázku č. 1 (dole) porovnávajícím architekturu LO myši (A) a lidí (B). Průměrný lidský LO dále tvoří 15-20 % buněk α produkujících glukagon, 5-10 % buněk δ vytvářejících somatostatin, 1 % ϵ buněk produkujících ghrelin a 2-5 % PP buněk, které vytváří tzv. pankreatický polypeptid (Stefan et al., 1982; In't-Veld & Marichal, 2010; Folli et al., 2018). Další odlišností mezi modelem myši a člověka je inervace LO. Nervová zakončení u myši navazují přímo na samotné endokrinní buňky (Lundquist & Ericson, 1978). Naopak u člověka zakončení komunikují nepřímo přes okolní hladké svalstvo LO (Rodriguez-Diaz et al., 2011).



Obrázek č. 1: Snímek imunohistochemicky obarveného řezu LO u myši (A) a člověka (B).

Převzato z Rorsman&Ashcroft, 2018, snímek pochází od: Dr. A.Clark, Oxford, měřítko 20 μ m.

V průběhu života se i u zdravého jedince zastoupení endokrinních buněk mění v řádu procent. Například u myši v průběhu života klesá množství α buněk na úkor buněk β (konkrétně z 27,7 % na 22,1 % a β buněk přibývá z 60,0 % na 64,9 %) (Marhfour et al., 2009).

V období zvýšeného metabolického stresu v průběhu těhotenství a obezity, dochází k nárůstu potřeby inzulinu a k ovlivnění architektury LO a β buněk. Zvýšená poptávka po inzulinu způsobuje hypertrofii LO (Oligvie, 1933; Hellman, 1960; Kim et al., 2010).

2.1.2 Vliv stárnutí na LO

Vzhled LO se v průběhu času mění na základě stimulů a potřeb organismu. V průběhu dospívání a stárnutí již od 3,5 měsíce věku dochází u zdravých laboratorních potkanů Sprague-Dowley krmených tzv. *ad libitum* (podle libosti) postupně k hyperplázii β buněk, která vyústí v hypertrofii LO (Dillberger, 1994). Výrazné morfologické změny lze pozorovat zejména u samců a u obou pohlaví mají ochrannou funkci kalorická omezení (Dillberger, 1994). Zvýšená produkce inzulinu v hypertrofických LO u hlodavců se zvýšenou plochou β buněk může vést k hyperinzulinémii (Mense & Rosol, 2018). S přibývajícím věkem se postupně snižuje schopnost β buněk vylučovat inzulin (Mense & Rosol, 2018) a v LO stoupá podíl fibrózní tkáně, která ve výjimečných případech nahradí většinu buněk LO (Dillberger, 1994).

2.1.3 Vliv diabetu II. Typu na LO

Cukrovka se dle příčiny dělí na dva základní typy. První typ (T1DM) se objevuje v raném mládí a způsobuje ho autoimunitní destrukce β buněk a absence inzulinu. Mluví se o něm jako o inzulin-dependentní či juvenilní cukrovce a jde o dědičnou autoimunitní chorobu. Řádově mnohem častější diabetes druhého typu (T2DM) se vyvíjí pomaleji a její vznik a vývoj lze ovlivnit životním stylem a fyzickou aktivitou. Vlivem periferní inzulinové rezistence a zvyšující se glykémie postupně dochází k porušení správné funkce β buněk a inzulinové dráhy. U T2DM hraje roli celkový rozvrat glukózové homeostázy a provází ho viditelné morfologické změny LO. Současné zvýšení hladin glukózy a mastných kyselin v krvi působí na β buňky tzv. glukolipotoxicky. To způsobuje poruchy metabolismu a zvýšenou produkci ROS a zánětlivých markerů v LO, které vedou k poničení β buněk a jejich schopnosti reagovat adekvátně na zvýšení glykémie.

Na počátku onemocnění dochází k hyperplázii β buněk, následně k hypertrofii LO a zvýšení produkce endokrinních hormonů, které má vést ke snížení dlouhodobé hyperglykémie v krvi (Klöppel et al., 1985). Dlouhodobá glukolipotoxicita však vede k nárůstu oxidativního stresu, vyčerpání a poničení β buněk. Při porovnání architektury LO u zdravého a diabetického pacienta dochází u T2DM jedinců ke snížení množství β buněk na úkor buněk α . U T2DM pacientů se snižuje celkový objem β buněk o 22 % a jejich hmotnost o 30 %. Ke zvětšení objemu naopak dochází u α buněk o 20 % (Sakuraba et al., 2002). Dlouhodobě u DM dochází ke snížení hmotnosti celé slinivky o 1 - 40 % (Folli et al., 2018). Vyrůstá také ukládání tzv. amyloidu v LO, jedná se o hromadění špatně poskládaných proteinů, které buňky nejsou schopné degradovat v proteasomu (Sakuraba et al., 2002).

2.1.4 Vliv stravy na LO

Normální dieta (ND) se u člověka skládá zejména ze sacharidů (55 %), bílkovin (20 %) a tuků, které by měly tvořit maximálně 30 % celkového energetického denního příjmu. Negativní vliv na metabolismus β buněk má nedostatek fyzické aktivity společně se zvýšeným příjmem jednoduchých cukrů a tuků. Zatímco u zdravého člověka stoupá v krvi po jídle hladina glukózy a v období hladu hladina mastných kyselin, u diabetických pacientů jsou v krvi obě živiny přítomny současně, díky často doprovázené obezitě, což působí glukolipotoxicky. Ke studiu T2DM na zvířecím modelu ve fyziologických podmínkách se využívá negativní vliv HFD. Již po několika týdnech způsobuje u hlodavců diabetický fenotyp: periferní inzulinovou rezistenci (Valle et al., 2011), narušení GSIS (Zhou & Grill, 1994; Carlsson et al., 1999), abdominální obezitu a narušení rovnováhy lipidů v krvi a chronickou zánětlivost (Valle et al., 2011).

Chronické podávání vysokoenergetické HFD nutí organismus zpracovat přebytečné MK formou uskladnění v tukových buňkách, aby nedocházelo k lipotoxicitě. V β buňkách dojde k přechodu na metabolismus MK a k adaptaci na výlev inzulinu i za nízké koncentrace glukózy v krvi (Assimacopoulos-Jeannet et al., 1997; Valle et al., 2011), která dlouhodobě může vést k inzulinové rezistenci cílových tkání s inzulinovým receptorem (IR). Díky HFD navozené zvýšené citlivosti K_{ATP} senzitivního kanálu (Carlsson et al., 1999), zvýšené expresi GK a proinzulinu (Valle et al., 2011) a zvýšené aktivitě fosfofruktokinázy (Liu et al., 1998) se stane β buňka citlivější ke glukóze. Současně dochází ke snížení aktivity pyruvát-dehydrogenázy (Zhou & Grill, 1995) a zvýšení transportu MK přes karnitin-palmitoyl transferázu 1 do mitochondrií (Assimacopoulos-Jeannet et al., 1997). Celkový výlev inzulinu při GSIS z LO u HFD potkanů s prediabetickým fenotypem je tak vyšší než u zdravé kontroly (Valle et al., 2011). Inzulin napomáhá uskladnění MK anabolickým účinkem na tukové buňky. Volné MK přispívají k poruše GSIS také snížením produkce adenosintrifosfátu (ATP) díky tzv. *uncouplingu*, nebo-li odpřažení vnitřní mitochondriální membrány (Carlsson et al., 1999; Garlid et al., 1996). HFD tak u β buněk vede k poruše správné GSIS (Liu et al., 1998) a rozvoji diabetického fenotypu.

HFD způsobuje změny v genové expresi β buněk a jejich redoxním prostředí (Valle et al., 2011). Dlouhodobé podávání vyvolává ER a peroxizomální stres, expresi zánětlivých markerů a snižuje expresi transkripčních faktorů typických pro β buňky: PAX4 (z angl. *paired box 4*) a GATA6 (z angl. *GATA binding factor 6*) (Cnop et al., 2014). HFD dieta snižuje expresi transkripčních faktorů PDX1, MAFA a NEUROD1 (z angl. *neuronal differentiation 1*, známý také jako β buněčný E-Box transaktivátor 2) a mnoho dalších (Cnop et al., 2014).

Nejen hyperglykémie ovlivňuje funkční schopnosti β buněk. Již několikahodinová hypoglykémie (hladovění) vede k ovlivnění jejich genové exprese a narušení správného průběhu GSIS (Giddings et al., 1993). Po 3 hodinách u potkanů s hypoglykemií (2,8 mM) dochází ke snížení hladiny mRNA pro GLUT2 (glukózový transportér 2) a inzulin 2 (Giddings et al., 1993).

2.2 β buňky

2.2.1 Charakteristika a hlavní funkce

Buňky β jsou vysoce specializované, aby mohly neustále reagovat na aktuální koncentrace glukózy v krvi. Po nárůstu glykémie jsou schopné zhruba třicetkrát navýšit syntézu proinzulinu (Schuit et al., 1991). V odpovědi na příjem potravy a navýšení glukózy a ostatních živin v krvi dojde k celkové aktivaci jejich metabolismu a tvorbu MCF, což vyústí v uvolnění sekrečních granul s inzulinem. Impulzem k výlevu sekrečních váčků pod membránou je nárůst glykémie nad bazální hodnoty, které se pohybují okolo 5,5 mM u člověka (Danaei et al., 2011) a 5-7 mM u myši (Sánchez-Andrés et al., 1995). Výlev má dvoufázový průběh. Po první výrazné fázi, která netrvá déle než 10-20 minut, kdy dochází k výlevu již zralých váčků s inzulinem připravených u membrány, následuje druhá pozvolnější fáze trvající několik hodin, kdy dochází k nárůstu tvorby inzulinu a k posunu nových váčků k membráně. Na základě poruch dvoufázového výlevu inzulinu u pacienta lze usuzovat na počátek T2DM.

Glukóza ovlivňuje výlev inzulinu z β buněk tzv. glukózou stimulovanou inzulinovou sekrecí (GSIS, z angl. *Glucose-stimulated insulin secretion*). Další živiny jako aminokyseliny (AK) a mastné kyseliny (MK) se podílejí na výlevu nižší měrou a ve fyziologických podmínkách vždy za přítomnosti glukózy (více informací o možných induktorech výlevu inzulinu a molekulárních mechanismech lze nalézt mimo jiné v mé bakalářské práci s názvem: Molekulární mechanismy výlevu inzulinu, 2018). V těle je za přirozených podmínek v reakci na příjem potravy výlev inzulinu do značné míry podpořen vlivem inkretinů z tenkého střeva (Shuster et al., 1988) a jejich účinku na s G proteiny asociovanými receptory (Wheeler et al., 1993). Patří sem glukagonu podobný peptid (GLP, z angl. *glucagone like peptide*) a gastrický inhibiční peptid (GIP).

Základním molekulárním mechanismem výlevu při GSIS je zvýšení cytoplazmatické hladiny ATP, uzavření K_{ATP} senzitivních kanálů, depolarizace membrány a zvýšení intracelulární hladiny Ca^{2+} . Ca^{2+} způsobí vylití prvních sekrečních granul a zároveň aktivuje citlivé molekuly, např. několik enzymů Krebsova cyklu, duální oxidázy (DUOX), fosfolipázu A2, adenylátcyklázu, a také např. proteinkinázu C (PKC), která fosforylací aktivuje závislé NOX (zde NOX2 a NOX1) k produkci ROS. Ca^{2+} patří mezi nejdůležitější MCF. Jsou to molekuly a ionty vzniklé aktivitou metabolismu živin, které ve fyziologických koncentracích napomáhají průběhu GSIS. Aktivace metabolismu β buněk vede k nárůstu intracelulární koncentrace MCF a k lokálním změnám v redoxním prostředí (Patterson et al., 2000). Mění se poměry oxidačně-redukčních partnerů, např. $NADH/NAD^+$, $NADPH/NADP^+$ a $FAD^{2+}/FADH_2$ a antioxidačních partnerů redukovaného glutathionu (2GSH) a oxidovaného glutathion disulfidu (GSSG), thioredoxinu redukovaného a oxidovaného (Trx_{red}/Trx_{ox}). Akutní zvýšení NADPH znamená nárůst aktivity NOX a zvýšené produkce dalšího MCF – molekuly H_2O_2 . Zatímco NOX4 produkuje přímo H_2O_2 , NOX1/2 produkují $O_2^{\cdot -}$, který je na H_2O_2 přeměněn superoxid dismutázami (SOD). Jejich produkce H_2O_2 má vliv

na správnou funkci β buněk (Morgan et al., 2009) a díky dlouhému poločasu života může H_2O_2 fungovat jako druhý posel (Lenzen, 2017).

Jakmile se sníží glykémie a dojde k odeznění signálu, β buňky se vrátí do klidového stavu a nadále dochází pouze k bazální sekreci inzulínu. Inzulín ve zkratce umožňuje cílovým periferním tkáním s IR přijímat glukózu z krve, využívat ji a ukládat jako zdroj energie. Zvyšuje glykogenezi v játrech, ukládání tuku v tukové tkáni a další anaboličké procesy v těle a tím napomáhá odstraňovat glukózu z krevního řečiště.

2.2.2 Adaptace a zrání/maturace β buněk

U myši začíná zrání β buněk zhruba v prvních 3 týdnech života *in utero* (Lavine, Chick, Like, & Makdisi, 1971). Schopnost uvolňovat inzulín ačkoli v malém množství v reakci na glukózu je pozorována již první den po porodu, kdy β buňky vylévají sekreční váčky již při nízkých koncentracích glukózy (2,8 mM) (Boschero et al., 1988; Carvalho et al., 2010). Vyšší stimulace jejich výlev prakticky nemění (16,7 mM) (Carvalho et al., 2010). Může za to například exprese hexokináz s vysokou afinitou ke glukóze. V procesu funkčního zrání se mění jejich exprese na jedinou izoformu IV, tzv. glukokinázu (GK) (Matschinsky, 1990), která je typická pro β buňky a funguje zde jako senzor zvýšené hladiny glukózy. Nezralé β buňky plodu a novorozence mají také nedokonalé NADPH přenašeče, které jim neumožňují reagovat na příjem glukózy dostatečným nárůstem NADPH (Tan et al., 2002). Také u nich zcela chybí konexin 36, který tvoří skulinové spoje (tzv. *gap junctions*) u maturovaných β buněk (Carvalho et al., 2010) a zajišťuje synchronní výlev inzulínu z LO.

Funkční maturaci β buněk a dalších endokrinních buněk LO provází změna složení stravy. Novorozenci konzumují na tuky bohaté mateřské mléko, které po odstavu vystřídá převážně sacharidová strava. Toto je zejména platné u myši. Změna v hlavním energetickém zdroji vede na úrovni metabolismu k přechodu od β oxidace MK ke glykolýze, což znamená změnu v oxidačně-redukčním prostředí. V jednom cyklu β oxidace vzniká molekula $FADH_2$ a NADH, v glykolýze dvě molekuly NADH. Oba substráty vedou k produkci NADPH a $FADH_2$ v Krebsově cyklu. Akutní zvýšení MK (např. palmitátu) podporuje průběh GSIS. Palmitát a další MK se váží na s G proteiny spojený receptor 40 (GPR40). GPR40 dále vyvolá nárůst intracelulární koncentrace Ca^{2+} , výlev sekrečních váčků a složení a aktivaci NOX2/1 (Graciano et al., 2013). Akutní zvýšení hladiny MK v krvi tak vede k nárůstu produkce ROS z NOX2/1 v cytoplazmě a podporuje výlev inzulínu (Graciano et al., 2013). Dlouhodobá HFD vede k nárůstu produkce ROS zejména v mitochondriích (Lin et al., 2012) a peroxizomech (Elsner et al., 2011; Lenzen et al., 1996), ale stoupá produkce i v cytoplazmě a ER (Lin et al., 2012). Peroxizomy β buněk mají sníženou expresi kataláz a hrozí tak zvýšení oxidačního stresu (Lenzen et al., 1996). Přechod na glykolýzu znamená tvorbu ROS v lépe chráněných mitochondriích a cytosolu, kde se v β buňkách nachází SOD a další antioxidační enzymy (viz. kapitola antioxidační obrana), které β buňku účinně chrání.

Změna v produkci H_2O_2 v jednotlivých buněčných organelách a cytoplazmě by mohla různě působit na změnu genové exprese β buněk. Při zrání dochází k expresi základních β specifických transkripčních faktorů, kam patří například PDX1, NKX6.1 (z angl. *NK homeobox protein*), NKX2.2, ISL1 (z angl. *insulin gene enhancer protein 1*) a PAX6 (Conrad et al., 2014), ke změnám hladin enzymů a dalších molekul zapojených do glykolýzy, Krebsova cyklu, elektron-transportního řetězce a inzulinové sekreční dráhy (Jacovetti et al., 2015; Stolovich-Rain et al., 2015; Yoshihara et al., 2016). Přesné molekulární mechanismy a zapojení redoxní signalizace popsané zatím nejsou. Znám je ovšem vliv zvýšené produkce H_2O_2 v mitochondriích, peroxizomech a ER při glukotoxicitě a glukolipotoxicitě. Negativně ovlivňují transkripci genů *Pdx1* a *MafA* a přesun těchto transkripčních faktorů PDX1 (Olson et al., 1995; Kitamura et al., 2002) a MAFA (Harmon et al., 2009) z jádra do cytozolu.

2.2.3 Subpopulace β buněk

Populace β buněk není homogenní a v jediném ostrůvku se nachází zatím blíže neprostudované množství subpopulací ovlivňujících výlev inzulinu. Mezi dospělými β buňkami byly popsány četné rozdíly, např. v množství kopií deoxyribonukleové kyseliny (DNA) (Ehrie & Swartz, 1974), schopnosti vylévat váčky s inzulinem (Salomon & Meda, 1986), v mitochondriálním metabolismu (Wikstrom et al., 2007) a také v sekreci dalších pankreatických hormonů, např. glukagonu (Katsuta et al., 2009; Katsuta et al., 2012).

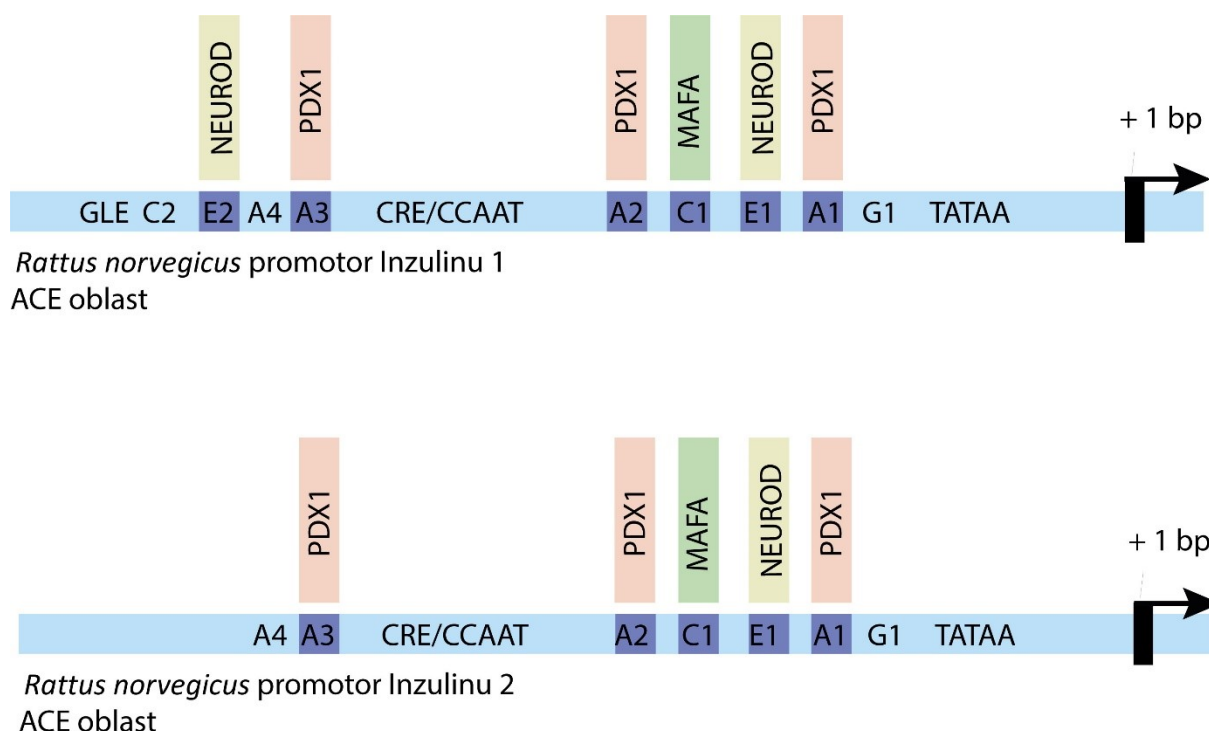
β buňky se mezi sebou liší v expresi základních β specifických molekul, např. u GLUT2 transportéru, PDX1 transkripčního faktoru, GK a adhezní molekuly E-katherinu (Heimberg et al., 1996; Roscioni et al., 2016; Wang et al., 2016). Mají různou genovou expresi molekuly Flattop dráhy Wnt (Roscioni et al., 2016) a povrchovým markerům CD9 a ST8SIA1 (Dorrell et al., 2016). Existuje poměrně dostatek informací o fenoménu změny genetické exprese různých populací β buněk a není vyloučeno zapojení redoxních regulací (Wang et al., 2016).

2.3 Inzulin

2.3.1 Základní transkripční faktory

Hlodavci jsou vybaveni setem dvou genů pro inzulin *rlns1* a *rlns2*. Lidé mají naopak gen pouze jeden, *hlns*, který je bližší *rlns2*. Geny jsou poměrně konzervované a na jejich ACE oblast promotoru zobrazenou na obrázku č. 2 se váží tři základní transkripční faktory (Sharma et al., 1995):

- PDX1 (nebo také STF1),
- MAFA (znám také jako *RIPE3 element binding protein 1*),
- NeuroD (znám také jako beta-2).



Obrázek č. 2: Schéma oblastí ACE promotoru genů pro inzulin 1, 2 *Rattus norvegicus* a vazby základních transkripčních faktorů NEUROD, PDX1 a MAFA.

Schéma zpracováno dle předlohy a informací z Melloul et al., 2002

2.3.2 Vliv dlouhodobé hyperglykémie a ROS na transkripční faktory

Dlouhodobá hyperglykémie a zvýšená produkce ROS v T2DM snižují expresi genu inzulinu, jeho obsah a celkovou sekreci (Robertson et al., 1992). Dochází k narušení genové exprese dvou základních transkripčních faktorů genu inzulinu a snížení jejich vazby na promotor: PDX1 (Olson et al., 1995) a MAFA (Sharma et al., 1995; Tanaka et al., 1999; Harmon et al., 1999). Může za to dráha c-Jun N-terminální kinázy (JNK) ($JNK \rightarrow p38 \rightarrow MAPK \rightarrow PKC$), kterou při rozvoji T2DM aktivuje oxidační stres (Kaneto et al., 2002). Za glukotoxických podmínek dochází k delokalizaci MAFA (Harmon et al., 2009) a PDX1 do cytoplazmy (Kaneto et al., 2002), kde jsou degradovány v proteazomu (Harmon et al., 2005). Této delokalizaci a destrukci lze zabránit umělým zvýšením hladin antioxidantních enzymů, např. glutathion peroxidázy 1 (GPx1) (Harmon et al., 2009) či přirozeně ROS vyvolanou aktivací *NF-E2 p45-related Factor 2* (Nrf2)/*Kelch ECH associating protein 1* (Keap, tzn. Nrf2/Keap) dráhy, která reguluje více jak 100 dalších genů zapojených v antioxidaci a detoxikaci buňky (Ishii et al., 2000).

PDX1 je důležitý transkripční faktor v průběhu zrání β buněk. Ovlivňuje expresi β specifických genů a následně expresi inzulinu (Marshak et al., 2000). V oblasti promotoru PDX1 genu je v oblasti upstream -6,5 kbp až -4,5 kbp po třech *forkhead*-vazebných sekvencích (Marshak et al., 2000), kam se váží FOX transkripční faktory (z angl. *forkhead/winged helix transcription factor*). Transkripční faktory

FOX ovlivňují genovou expresi β buněk a jejich proliferaci a regeneraci (Kitamura et al., 2002). FOX-A2 (znám také jako HNF-3 β) je aktivátorem exprese genu *Pdx1* (Lee et al., 2002). V β buňkách se exprimuje zejména FOX-O1, který je součástí IRS2 signalizační dráhy (dráhy substrátu 2 inzulinového receptoru) a expresi *Pdx1* naopak inhibuje (Kitamura et al., 2002). FOXO proteiny jsou regulované oxidačním stresem a růstovými faktory. Zatímco inzulin a růstové faktory vedou k jejich přesunu z jádra do cytoplazmy přes PI₃K a proteinkinázu B (PKB, jinak nazývána Akt) (Biggs et al., 1999), oxidačním stresem a cytokiny aktivovaná c-Jun-N-terminální kináza (JNK) vede k jejich přesunu do jádra (Essers et al., 2004).

Dlouhodobá hyperglykémie vede ke zvýšené tvorbě TRX inhibičního proteinu (TRXNIP), který snižuje aktivitu TRX antioxidačního systému a současně ovlivňuje genovou expresi pomocí několika mikro RNA (miRNA). Jedním z nich je miRNA-204, která vede ke snížení exprese základního transkripčního faktoru inzulinu *MafA* (Xu et al., 2013). Tímto zásahem dlouhodobá hyperglykémie zásadně ovlivňuje dysfunkci β buněk a rozvoj DM.

2.3.3 Maturace inzulinu a exocytóza váčků

K tvorbě tří disulfidických můstků (SS) v molekule proinzulinu dochází v ER. Propojení SH skupin cysteinů umožňuje enzym protein disulfid izomeráza (PDI) společně s ER oxidoreduktinem 1 (Ero1) (Tu & Weissman, 2002). Ero1 umožňuje reoxidaci použitého PDI a sám se oxiduje O₂ za vzniku jedné molekuly H₂O₂. Ta je v ER u hlodavců ničena antioxidačním enzymem peroxiredoxin 4 (Prdx4) (Tavender et al., 2008), u lidí pak také GPx7/8 (Nguyen et al., 2011; Lenzen, 2017).

Složený proinzulin se třemi disulfidickými můstky putuje do Golgiho aparátu. Z trans-Golgi jsou odštěpeny klathrinové váčky s proinzulinem, pro jehož štěpení je důležitá změna pH, k níž dochází uvnitř váčku. Enzymy sestřihu jsou aktivní pouze při kyselém pH (Davidson et al., 1988; Davidson & Hutton, 1987). Nejprve dojde k odštěpení C peptidu pomocí Ca²⁺ dependentních enzymů PC1 a PC2 (Davidson et al., 1988), které se aktivují okyselením váčků. V následujícím kroku je odštěpena C terminální sekvence karboxypeptidázou CPE, CPE závisí na okyselení lumen váčku a na přítomnosti Zn²⁺, kterého je zde dostatek (Davidson & Hutton, 1987).

Zralá granula obsahuje kompaktní krystaly inzulinu, nezralé váčky naopak granulární molekuly proinzulinu (Orsi et al., 1987). Díky tomu jsou dobře odlišitelná na snímcích z elektronového mikroskopu. Výsledná molekula inzulinu se skládá z 21AK dlouhého řetězce A a 30AK řetězce B spojených disulfidickými můstky v polohách A7-B7, A20-B19 a A7-A11.

Pro splynutí sekrečních váčků s membránou musí dojít ke zvýšení intracelulární hladiny Ca²⁺ a k sestavení komplexu ze SNARE proteinů (z angl. *soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein (SNAP) receptor*). Dojde ke spojení R-SNARE (Qc-VAMP-2) na membráně váčku, syntaxinu-1a (Qc-SNARE) a SNAP-25 (Qy-Qb SNARE) na cytoplazmatické membráně.

2.3.4 Cílové tkáně a účinky inzulinu

Hlavním mechanismem působení inzulinu je zvýšení glykogeneze v játrech a svalech, glykolýzy a lipogeneze v játrech, svalech a tukové tkáni, snížení glukoneogeneze a glykogenolýzy v játrech a zvýšení počtu GLUT4 receptorů na membráně adipocytů, hepatocytů a buněk kosterního svalstva. Inzulin je jediný hormon, který dokáže účinně snižovat hladinu krevní glukózy. Antagonisticky působí glukagon z LO buněk α a také adrenalin z dřeně nadledvin, trijodthyronin a tyroxin ze štítné žlázy, kortizol z kůry nadledvin a růstové faktory, které snižují citlivost k inzulinu (Holeček, 2016). Dlouhodobá hyperglykémie a zvýšená hladina triglyceridů v krvi vede k rozvoji inzulinové rezistence v cílových tkáních s inzulinovým receptorem (IR).

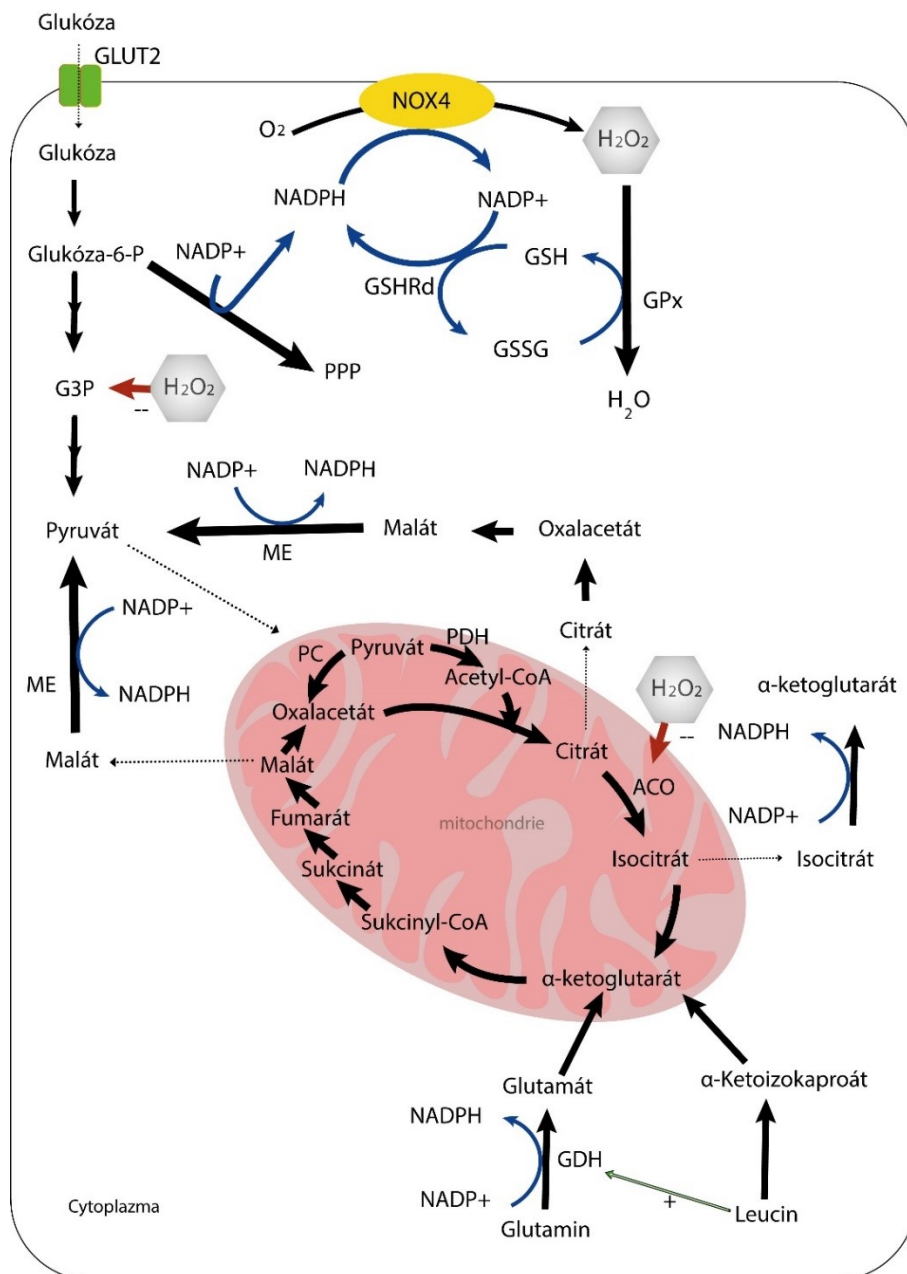
2.4 Redoxní homeostáza β buněk

Redoxní prostředí se v β buňkách mění v závislosti na přítomnosti glukózy a dalších vnějších stimulů. Jednotlivé orgány se liší v zastoupení antioxidantních enzymů a způsobu produkce ROS. H_2O_2 patří mezi MCF, který prokazatelně při fyziologické koncentraci okolo 1-4 μM podporuje správný průběh GSIS. Jeho snížená či zvýšená tvorba má negativní dopad na výlev inzulinu (Pi et al., 2007). V průběhu metabolismu glukózy v β buňkách stoupá celková produkce NAD(P)H a $FADH_2$, které jako substrát využívají elektron-transportní řetězec na vnitřní mitochondriální membráně, antioxidantní systémy, NAD(P)H oxidázy a mnohé další molekuly. Zapojení NAD(P)⁺/NAD(P)H a H_2O_2 z NOX4 zobrazuje obrázek č. 3.

Po příjmu glukózy a vyvolání GSIS dochází k prostorově oddělenému dvoufázovému nárůstu hladiny NAD(P)H. Nejprve dojde k rychlé cytosolické produkci v pentózofosfátovém cyklu (PPP) a glykolýze a následně k mnohonásobně vyšší produkci NAD(P)H v mitochondriích (Patterson et al., 2000). Vysvětlením tohoto jevu je kotransport protonu a pH senzitivita pyruvátového transportéru na vnitřní mitochondriální membráně. Počáteční zvýšení produkce NAD(P)H v cytosolu vede ke spřažení s glycerol-fosfátovými a malát-aspartátovými přenašeči a ke zvýšení potenciálu na vnitřní mitochondriální membráně. Zvýšení membránového potenciálu mitochondrií vede k nárůstu transportu pyruvátu do organely, Krebsova cyklu a produkce mnohonásobně vyššího množství NAD(P)H v mitochondriích (et al., 2000).

Po akutním zvýšení koncentrace glukózy stoupá poměr NADPH/NADP⁺ u potkaních INS-1E 4,3krát (Munhoz et al., 2016). Na základě změny hladin NAD(P)H/NAD(P)⁺ dochází lokálně k ovlivnění citlivých proteinů. NADPH má vliv na napěťově-řízený K⁺ kanál Kv2.1 (MacDonald et al., 2003), který vyvolává repolarizaci cytoplazmatické membrány po zvýšení intracelulárního vzrůstu Ca²⁺. Nárůst NADPH vede ke zvýšení produkce ROS místním konstitutivně aktivním enzymem NOX4 a také antioxidantních enzymů thioredoxin reduktáz (TrxRd), glutathion reduktáz (GSHRd), atd. Přirozeně se tedy při metabolismu glukózy a v průběhu GSIS mění redoxní rovnováha v mírně pro-oxidační. V jednotlivých částech buňky se mohou objevovat rozdíly díky specifické produkci ROS a lokalizaci antioxidantních enzymů. Redoxní

regulace ať už vlivem ROS či antioxidačních enzymů zahrnují modifikace na aminokyselinách (např. cysteinu a methioninu). Dochází k reverzibilním modifikacím SH skupiny a vzniku cysteinových můstků, tzv. disulfidů (SS), nitrosylů (SNO), sulfenylů (SOH), sulfhydrátů (SSH) a napojení na glutathion (SSG) (Araki et al., 2016).

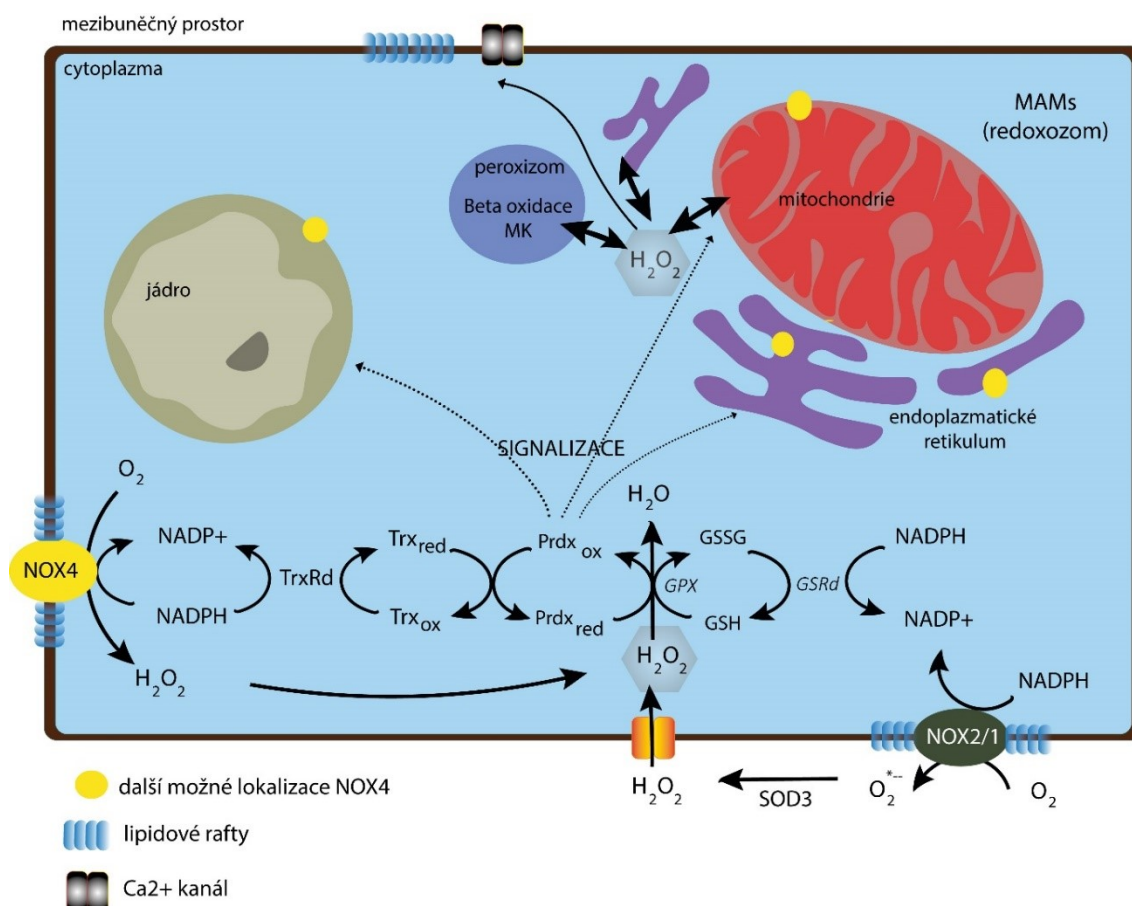


Obrázek č. 3: Vliv glukózy, NAD⁺/NADPH, L-leucinu a H₂O₂ na glykolýzu a Krebsův cyklus v β buňkách,

zpracován dle Munhoz et al., 2016, ME – Malát dehydrogenáza (z angl. *malic enzymes*), GLUT2 – glukózový transportér 2, G3P – glycerol-3-fosfát, NAD⁺/NADPH – oxidovaná a redukovaná forma nikotinamíadeninindukleotidfosfátu, NOX4 – NADPH oxidáza 4, GSH/GSSG – redukovaný a oxidovaný glutathion, GSHRd – glutathion reduktáza, GPx – glutathion peroxidáza, PPP – pentózo-fosfátový cyklus, PC – pyruvát karboxyláza, PDH – pyruvát dehydrogenáza, ACO – akonitáza, GDH – glutamát dehydrogenáza.

ROS vznikají v každé eukaryotické buňce. Zhruba 2 % z celkového množství přijatého kyslíku ze vzduchu se přeměňuje na $O_2^{\cdot-}$ radikál (Cadenas & Davies, 2000). Ten se spontánně či pomocí antioxidantních enzymů přeměňuje na vodu a méně reaktivní ale stabilnější peroxid vodíku, H_2O_2 (Lenzen, 2017). H_2O_2 díky své lipofilní povaze dokáže volně procházet skrz buněčné membrány či asistovanou difúzi přes aquaporiny (Bienert et al., 2007). Následně pak lokálně působí jako druhý posel, ať už jde o endogenní či z okolí přijatý H_2O_2 produkovaný např. makrofágy LO. Mezi ROS má nejdelší dobu biologického života, která může dosáhnout v závislosti na antioxidaci do 1 minuty (Lenzen, 2017). Působí pouze lokálně v místě svého vzniku uvnitř mikrodomén a kompartmentů (Mishina et al., 2011). Pokud ROS projdou například jadernou membránou, jsou v cytosolu rychle degradovány Prdx/Trx antioxidantním systémem (Mishina et al., 2011).

β buňky mají oproti ostatním sníženou hladinu antioxidantních enzymů (Grankvist et al., 1981). Snížená je zejména hladina kataláz, které přeměňují H_2O_2 na vodu v peroxizomech (Lenzen et al., 1996; Tiedge et al., 1997), což stálo za hypotézou důležitosti H_2O_2 a dalších ROS na jejich správnou funkci i na rozvoj DM. Jejich produkce ROS při porovnání se specializovanou buňkou imunitního systému po zvýšení glykémie za 2 hodiny dosahuje zhruba 66 % produkce neutrofilu (Oliveira et al., 2003). β buňky jsou vybaveny dalšími antioxidantními systémy. Významný je u nich antioxidantní systém Prdx/Trx a thioredoxin reduktá (TrxRd), které regulují hladiny H_2O_2 (Stancill et al., 2019). Prdx a Trx společně s TrxRd reagují na kontinuální příliv H_2O_2 v mikromolárních koncentracích (Stancill et al., 2019), což z nich činí kandidátní regulační systém pro konstitutivně aktivní NOX4. Nedokážou však odvrátit negativní vlivy strmého nárůstu H_2O_2 v krátkém čase (Stancill et al., 2019), čímž se vysvětluje negativní působení ROS v progresi DM při dlouhodobé hyperglykémii a glukolipotoxicitě. Ve fyziologických hladinách však H_2O_2 působí jako MCF podporující správný průběh GSIS (Pi et al., 2007). Schéma zapojení NOX do buněčné signalizace skrze Prdx/Trx systém znázorňuje obrázek č. 4.



Obrázek č. 4: Zapojení NADPH oxidáz do redoxního signalizace β buněk,

vytvořen dle Roma & Jonas, 2019, MK – mastná kyselina, MAMs – redoxozom, s mitochondriemi asociované membrány (z angl. *mitochondria associated membranes*), SOD3 – superoxid dismutáza 3 (Cu/Zn), NOX4 – NADPH oxidáza 4, NOX2/1 – NADPH oxidáza 2 nebo 1, TrxRd – thioredoxin reduktáza, X_{red} – enzym v redukované formě, X_{ox} – enzym v oxidované formě, Trx – thioredoxin, Prdx – peroxiredoxin, GPX – glutathion peroxidáza, GSSG – oxidovaný glutathion, glutathion disulfid, GSH – glutathion, redukováný, GSRd – glutathion reduktáza.

Dlouhodobá hyperglykémie může vést k narušení přirozené rovnováhy oxidačně redukčních partnerů (rozebráno například v Luo et al., 2016) a zvýšené tvorbě ROS. K narušení rovnováhy při dlouhotrvající hyperglykémii přispívá také zvýšená aktivita polyolové dráhy (Fantus, 2002 podle informací v Luo et al., 2016) produkující NADH z NADPH a dráhy poly-adenosindifosfát (ADP)-ribózy polymerázy (Chiu et al., 2008; Wu et al., 2017), která vede k destrukci NAD⁺. Ubývá tak NADPH pro recyklaci antioxidačních enzymů.

Oxidativní stres spolu se sníženou tvorbou ATP jsou pokládány za hlavní příčinu poruch funkce β buněk u T2DM. Aktivita ATP syntázy je po dlouhotrvající hyperglykémii u diabetiků výrazně snižena na rozdíl od ostatních komplexů elektron-transportního řetězce (ETC, z angl. *electron transport chain*) (Wu et al., 2017). Stoupající produkci ROS v ETC tak neprovází výroba ATP nýbrž pokles produkce ATP, což může vést až k apoptóze β buněk.

2.5 Zdroje ROS

Jako v ostatních eukaryotických buňkách jsou nejdůležitějšími zdroji ROS v β buňkách mitochondrie, ER, peroxizomy a cytosol/membránové lipidové rafty (Mishina et al., 2011). Díky jejich prostorovému členění a rozmístění může lokální produkce ROS vyvolat místně specifické signální účinky a vést k různým podobám oxidačního stresu. Mluvíme pak o mitochondriálním, endoplazmatickém či peroxizomálním stresu. Vznikající ROS mají různou míru reaktivity a délku poločasu života, jak je vidět v tabulce č. 1. H_2O_2 je nejstabilnější ROS a spolu s NO^* dokáže prostoupit biologickými membránami. Jeho difuze je však silně prostorově a časově omezená mimo jiné díky přítomnosti Prdx/Txn antioxidační obrany. Může projít například jadernou membránou do cytosolu, kde je ovšem rychle degradován (Mishina et al., 2011).

Produkce ROS v jednotlivých kompartmentech stoupá v reakci na různé stimuly a vyvolává odlišnou odpověď. Výrazným zdrojem ROS jsou komplexy I a III ETC, metabolismus hexosaminů, sorbitolu, reakce cytochromu p450, Fentonova reakce, oxidace NADPH pomocí NOX, autooxidace glycerinaldehyd-3-fosfátu a mnohé další, viz review (Robertson, 2004). Ty nejdůležitější zdroje ROS v β buňkách budou probrány v této kapitole.

Tabulka č. 1: Důležité reaktivní formy kyslíku a jejich vlastnosti dle Lenzen, 2017

ROS	poločas života	prostupnost membránami	reaktivita	lokální koncentrace
$\text{O}_2^{\bullet-}$	> 1 s	×	●●●●	1×10^{-12}
H_2O_2	> 1 min	✓	●●●	1×10^{-9} po stimulaci až 1×10^{-6}
OH^*	1 nsec	×	●●●●●	
NO^*	> 1 s	✓	●●●●	
ONOO^-	< 1 s	×	●●●	

$\text{O}_2^{\bullet-}$ superoxid, H_2O_2 peroxid vodíku, OH^* hydroxylový radikál, NO^* radikál oxidu dusnatého, ONOO^- peroxyinitrit

2.5.1 Mitochondrie

Mitochondrie jsou v β buňkách důležitou a nepostradatelnou organelou. Odehrává se v nich hlavní část metabolismu glukózy i MK. V ETC vzniká $\text{O}_2^{\bullet-}$ v komplexech I a III a dále je degradován mitochondriální Mn-SOD a cytosolickou Cu/Zn-SOD na H_2O_2 . Jak ukázaly výsledky naší laboratoře, produkce ROS v mitochondriích se za fyziologických podmínek v β buňkách po vystavení krátkodobé hyperglykémii nezvyšuje. Výrazný je ovšem nárůst ROS v cytoplazmě (Plecita-Hlavata et. al., 2020). Ke zvýšené produkci ROS v mitochondriích dochází při dlouhodobé hyperglykémii a v glukolipotoxických podmínkách u T2DM (Sakai et al., 2003; Lin et al., 2012; Wu et al., 2017). Stálý nadbytek živin v krvi zvyšuje aktivitu ETC komplexů I, II, III a IV, což vede ke zvýšené produkci NAD^+ a FAD^+ do matrix a ROS do matrix a mezimembránového prostoru (Wu et al., 2017). Aktivita ATP syntázy (komplexu V) však

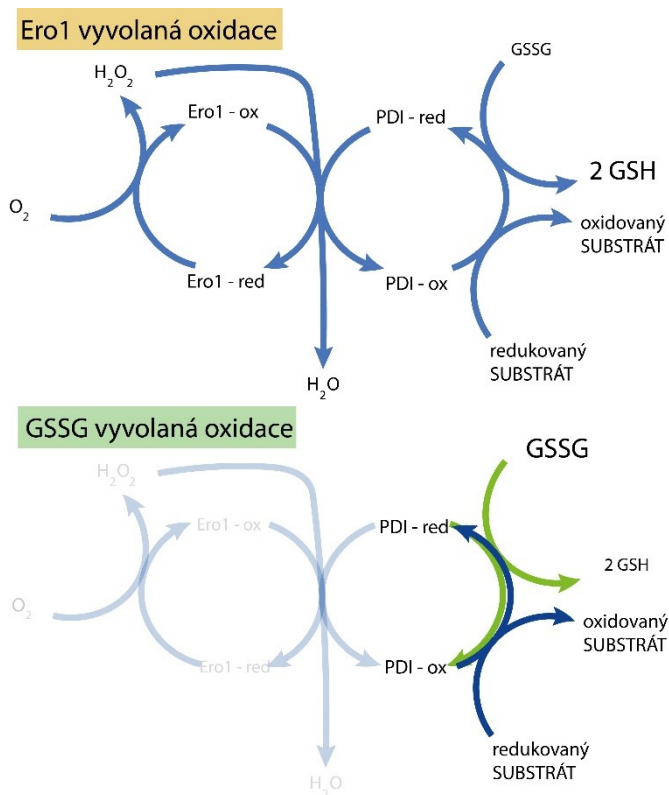
razantně klesá a není dostatek ATP pro zajištění energetických potřeb buňky (Wu et al., 2017), což se odrazí na poruše GSIS a životnosti β buněk. Dlouhodobou hyperglykemií vyvolaný nárůst produkce ROS v mitochondriích snižuje aktivitu glyceralddehyd-3-fosfát dehydrogenázy (GA3PDH), což vede ke zpomalení glykolýzy a produkce ATP (Sakai et al., 2003). Snížení produkce ATP a zvýšená produkce ROS v mitochondriích při dlouhodobé hyperglykémii může vést k apoptóze β buněk.

Mitochondriální ROS v přirozeném množství chrání buňku před nárůstem oxidačního stresu odpážením vnitřní mitochondriální membrány. Lokálně aktivují odpřahovací protein 2 (UCP2, z angl., *uncoupling protein 2*) čímž tlumí produkci dalších ROS v ETC (Chan et al., 1999). Při GSIS spolu s ROS z NOX aktivují ryanodinové receptory 2 (RyR2) (Pi et al., 2007) a napomáhají tak zvýšení koncentrace Ca^{2+} v buňce. Dále uvnitř mitochondriální matrix vznikají $\text{O}_2^{\bullet-}$ a H_2O_2 činností dehydrogenáz 2-oxokyselin (Roma & Jonas, 2019). Skládání proteinů a tvorba disulfidických můstků v mezimembránovém prostoru mitochondrií díky spřažení s ETC nevede k tvorbě ROS (Bihlmaier et al., 2007), jako je tomu v ER.

2.5.2 Endoplazmatické retikulum

ER slouží k tvorbě a skládání proteinů, lipidů a je místem uložení intracelulárních zásob Ca^{2+} . Při tvorbě tří disulfidických můstků v molekule inzulinu v ER vzniká množství H_2O_2 . Oxidaci cílových SH skupin substrátu má za úkol disulfid izomeráza (PDI) ve spolupráci s ER oxidoreduktinem-1 (Ero1) (Tu & Weissman, 2002). Ero1 akceptuje elektron na svou FAD skupinu za vzniku FADH_2 a během každé recyklace FADH_2 oxidací O_2 vzniká jedna molekula H_2O_2 (Tu & Weissman, 2002). Během jedné minuty je vytvořeno zhruba 334 000 molekul inzulinu (Schuit et al., 1991; Lenzen, 2017). Na základě tvorby tří disulfidických můstků v každé z nich vzniká za minutu jen díky skládání inzulinu množství H_2O_2 blížící se milionu molekul.

Uvnitř ER je tvorba ROS u Ero1/PDI systému těsně spjata s antioxidační obranou, jak je vidět na obrázku č. 5 vpravo. H_2O_2 vzniklé při skládání proteinů při regeneraci Ero1 může být použito k oxidaci



Obrázek č. 5: Schéma Ero1/PDI/GSH systému v ER

Vytvořeno dle Appenzeller-Herzog et al., 2010.

PDI (Karala et al., 2009), nebo ho spotřebovávají peroxidázy Prdx a GPx. Pokud je dostatek redukovaného PDI díky tvorbě disulfidových můstků v molekule substrátu (schéma nahoře), Ero1 aktivně produkuje ROS při své reoxidaci molekulárním kyslíkem. O oxidovaný PDI se substrátem soutěží glutathiondisulfid (GSSG). V případě, že se koncentrace GSSG rapidně navýší a není dostatek volného glutathionu (GSH) (schéma dole), přednostně s redukovaným PDI reaguje GSSG a vzniká GSH a oxidovaná forma PDI, která se mění na redukovanou reakcí se substrátem. Vlivem úbytku redukované PDI dochází k inhibici tvorby ROS Ero1 v ER dokud se znovu neobnoví původní rovnováha (Appenzeller-Herzog et al., 2010).

Prdx pomocí cysteinu v aktivním místě redukuje H_2O_2 na vodu a samy se oxidují a mění na neaktivní formu. Musí dojít k jejich reaktivaci v cytosolu a mitochondriích pomocí sulfiredoxinů (Srx) (Biteau et al., 2003). V opačném případě inaktivované Prdx oligomerizují a mění se v molekulární chaperony (Tavender et al., 2008), čímž napomáhají ke správnému skládání proteinů a oddalují UPR dráhu (z angl. *unfolded protein response*). V ER β buněk hlodavců se vyskytuje pouze Prdx4 (Tavender et al., 2008) a to ve velmi nízkém množství (Mehmeti et al., 2014). V lidských β buňkách se nachází Prdx4 a také Prdx7 a Prdx8 (Nguyen et al., 2011). Prdx7 a 8 přímo fyzicky komunikují s Ero1, díky čemuž jsou lidské β buňky lépe chráněné proti ROS vyvolaném ER stresu (Nguyen et al., 2011).

Nárůst tvorby inzulinu za dlouhodobé glukolipotoxicity při T2DM vede k nárůstu ER stresu (Melo et al., 2017), který může aktivovat UPR dráhu a vyvolat apoptózu β buněk.

2.5.3 Peroxizomy

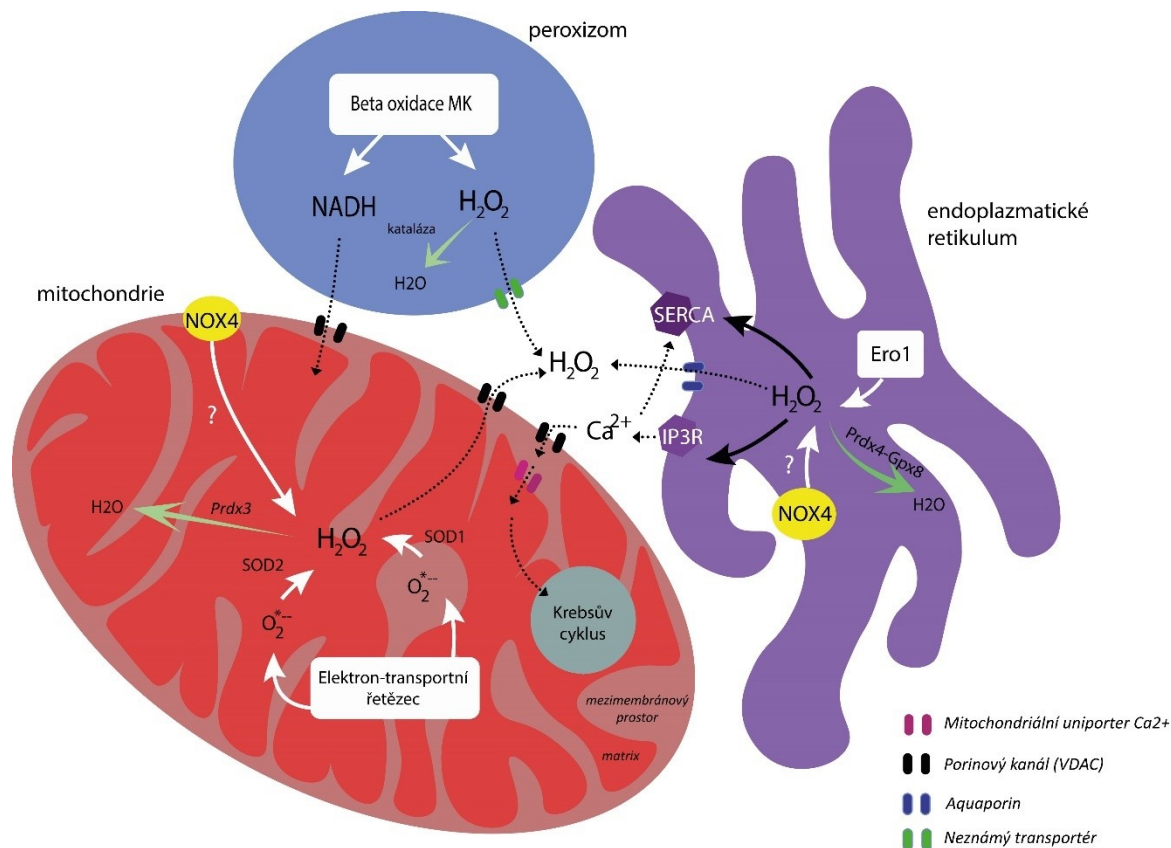
Peroxizomy buňkám slouží zejména k metabolismu lipidů. Díky nízké antioxidační obraně jsou hlavním zdrojem ROS a oxidačního stresu v lipotoxických podmínkách (Elsner et al., 2011). Probíhá v nich β -oxidace dlouhých MK, při které vzniká H_2O_2 (Lazarow & DeDuve, 1976). U ostatních tělních buněk jsou v peroxizomech antioxidační enzymy katalázy, které ho přetváří na H_2O a O_2 . U β buněk však katalázy prakticky chybí (Lenzen et al., 1996; Tiedge et al., 1997) a zvýšená β oxidace dlouhých mastných kyselin tak vede k nárůstu peroxizomálního stresu (Elsner et al., 2011).

2.5.4 S mitochondriemi asociované membrány (MAMs, z angl. *mitochondrial associated membranes*)

MAMs umožňují sdílení informací o redoxním prostředí mezi mitochondriemi, ER a peroxizomy. Díky tomuto propojení a lokalizaci specifických proteinů a enzymů na MAMs navzájem ovlivňují svůj metabolismus. Spojení mitochondrií, ER a peroxizomů skrz MAMs vytváří vyšší celek, tzv. „redoxozom“ (z angl. *redoxosome*) či „redoxní trojúhelník“, ve kterém skrz póry aquaporiny difunduje volně H_2O_2 (Yoboue et al., 2018). Například lipotoxicitou způsobený nárůst produkce ROS v mitochondriích přímo

souvisí s endoplazmatickým stresem a ER vyvolanou apoptózou (Lin et al., 2012). Schéma redoxozomu zobrazuje obrázek č. 6.

Samotný H_2O_2 zřídka přenáší signál přímo, ovšem může například působit na citlivé vápenaté kanály či kardiolipiny v membráně (viz. schéma redoxozomu). Funkce MAM zahrnuje zejména metabolismus lipidů a fosfolipidů (Lewin et al., 2002), transport a výměnu Ca^{2+} do mitochondrií a podílí se na zánětlivé odpovědi a tvorbě inflamazomu.



Obrázek č. 6: Schéma redoxozomu (MAMs),
zpracovaný dle předlohy a údajů Yoboue et al., 2018.

V mitochondriální matrice vzniká $\text{O}_2^{\bullet-}$, které je v matrice a mezimembránovém prostoru mitochondrií SOD1/2 přeměněno na H_2O_2 . Následnou reakcí s Prdx4 vzniká v mitochondriích neškodná molekula vody. H_2O_2 vzniká také v ER při skládání proteinů (Ero1) a z konstitutivně aktivní NOX4. Působí na Ca^{2+} pumpu SERCA a IP3R. Je zde degradován Prdx4, GPx7/8 na vodu. Produkci H_2O_2 v peroxizomech zvyšuje metabolismus tuků a jejich antioxidační obrana je velmi nízká. H_2O_2 může v omezené míře přes poriny v membránách organel difundovat do okolí a ovlivňovat blízké membránové molekuly, např. IP3R na ER. Aktivace IP3R vede k výlevu Ca^{2+} , které může putovat do mitochondrií/cytoplazmy, kde zvyšuje GSIS. Zkratky: SOD1/2 – superoxid dismutáza 1/2, Prdx3 – peroxiredoxin 3, NOX4 – NADPH oxidáza 4, IP3R – inositol trifosfátový receptor, SERCA – Sarko/endoplazmatická ATP pumpa Ca^{2+} , Prdx4 – peroxiredoxin 4, Gpx8 – glutathion peroxidáza 8, Ero1 – oxidoreduktin 1 endoplazmatického retikula.

2.5.5 NADPH oxidázy (NOX)

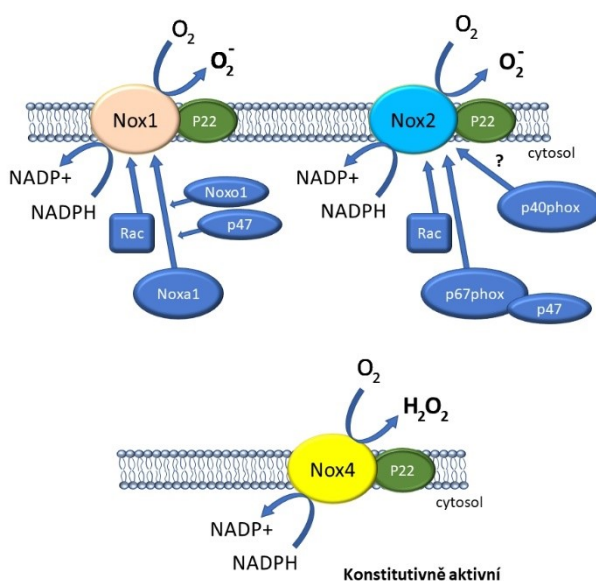
Zatímco ROS pocházející z ER, peroxizomů a mitochondrií jsou vedlejším produktem a hrají roli v patologických stavech, produkce ROS z NOX je důležitá pro správnou funkci β buněk (Morgan et al., 2006) a jejich inhibice vede přímo k narušení GSIS. Jsou aktivované po příjmu glukózy (Morgan et al., 2006) a umožňují tvorbou NADP^+ využití glukózy v PPP cyklu, ve kterém vzniká NADPH. Vzhledem ke snížené hladině laktát dehydrogenázy v β buňkách (Sekine et al., 1994) je jejich tvorba NADP^+ v cytosolu nezanedbatelná.

V β buňkách dochází k expresi NOX1, NOX2 (Oliveira et al., 2003) a NOX4 (Newsholme et al., 2009). V nejvyšším množství je zde NOX2, o něco méně NOX4 a NOX1 je zde v minimálním zastoupení (Newsholme et al., 2009). Fagocytární NOX2 jako první objevená NADPH oxidáza stojí za vznikem zkratk podjednotek phox (z angl. *phagocytic oxidase*).

NOX se obecně skládají z flavocytochromu b_{558} , který tvoří dvě podjednotky stabilizující se navzájem. Jde o katalytickou glykoproteinovou podjednotku $\text{gp91}^{\text{phox}}$ (někdy také Cybb) a regulační podjednotku p22^{phox} (někdy Cyba) (Geiszt & Leto, 2004). Část $\text{gp91}^{\text{phox}}$ šestkrát prochází membránou, váže flavin, hemovou skupinu a NADPH (Lambeth et al., 2007). Všechny NOX se shodují ve vazebných sekvencích pro FAD (Shiose et al., 2001). V NOX2 je základní flavocytochrom doplněn o několik regulačních podjednotek (p47^{phox} , p67^{phox} , p40^{phox}) a malé GTPázy Rac1 a Rac2 (Geiszt & Leto, 2004).

Mechanismus aktivace a funkce NOX se mezi jednotlivými typy liší dle jejich stavby. U NOX2 musí dojít k aktivaci heterodimeru $\text{gp91}^{\text{phox}}/\text{gp22}^{\text{phox}}$ pomocnými proteiny (p40^{phox} , p47^{phox} (či Ncf1), p67^{phox}) a malou GTPázou Rac. Po přijmutí signálu je p47^{phox} fosforylována na serinových zbytcích PKC a protein se přesouvá spolu s p40^{phox} a p67^{phox} z cytosolu k membráně (Lambeth et al., 2007). Malá Rho GTPáza (Rac-GTP) se váže přímo na $\text{gp91}^{\text{phox}}$ a p67^{phox} (Koga et al., 1999). Čísla proteinů „p“ udávají jejich molekulovou hmotnost v kDa. NOX2 je nejčastějším typem NOX v β buňkách a po stimulaci PKC produkuje do okolí $\text{O}_2^{\cdot-}$.

Prvním objeveným homologem NOX2 byla oxidáza NOX1 (Suh et al., 1999), která je obdobou NOX2. Její katalytická podjednotka je z 56 % shodná s její $\text{gp91}^{\text{phox}}$ podjednotkou (Kikuchi et al., 2000; Geiszt & Leto, 2004). Oproti NOX2 a NOX4 je ovšem NOX1 v β buňkách exprimovaná v nejmenším množství (Newsholme et al., 2009).



Obrázek č. 7: Schéma NADPH oxidáz přítomných v β buňkách

NOX4 má zhruba 39% homologii s katalytickou podjednotkou NOX2 a 35% homologii s NOX1 (Shiose et al., 2001). Katalytická gp91^{phox} podjednotka NOX4 závisí pouze na přítomnosti p22^{phox} a tak NOX4 je připravena k tvorbě ROS neustále bez potřeby aktivace dalšími asociovanými proteiny či malými GTPázami (Martyn et al., 2006). Na základě její přítomnosti zejména v ledvinách je někdy NOX4 označována také jako Renox (z angl. *renal oxidase*) (Geiszt et al., 2000; Shiose et al., 2001).

2.5.5.1 Druhy NADPH oxidáz, NOX1-5, DUOX1-2 a jejich tkáňová specifita

Enzymové komplexy NOX jsou membránově vázané flavocytochromy. Jejich exprese je tkáňově specifická a liší se zejména ve způsobu aktivace a v druhu ROS, který produkují (viz. tabulka č. 2). Jejich tvorbu ROS akutně zvyšuje glukóza, palmitát, (Morgan et al., 2006), PDGF (z angl. *platelet derived growth factor*)(Sundaresan et al., 1995), angiotensin 2 (Griendling et al., 1994), TGFβ-1 (z angl. *transforming growth factor β 1*)(Ohba et al., 1994), EGF (z angl. *epidermal growth factor*)(Bae et al., 1997), tumor-nekrotizující faktor α (TNFα) a interleukin 1 (IL1)(Meier et al., 1989; Morgan et al., 2006).

Jejich funkci lze ilustrovat na NOX2 situované na membráně fagozomu u neutrofilů. V přítomnosti patogenu dochází k sestavení a aktivaci NOX2 na membráně. Enzym umožní přenos elektronů z NADPH na molekulu O₂ za vzniku NADP⁺ na cytoplazmatické straně a reaktivního O₂^{-*} vně buňky/směrem do lumen váčku. O₂^{-*} se spontánně přeměňuje na peroxid vodíku a dále na kyselinu chlorovodíkovou, které patogen zahubí. NOX2 produkuje ROS velmi rychle a ve vysokém množství. Při nesprávném rozpoznání patogenu hrozí poškození vlastních tkání organismu (např. u aterosklerózy, kdy aktivují adhezi makrofágů). Ostatní NADPH oxidázy, které mají funkci vnitřně-signalizační, ROS vytváří na základě odlišného stimulu/kontinuálně v menší míře a dovnitř do cytosolu buňky (nikoli extracelulárně). Podobně jako NOX2 vytváří O₂^{-*} také NOX1, NOX3 a NOX5. Konstitutivně aktivní NOX4 a vápníkem aktivované duální oxidázy 1 a 2 (DUOX1/2) produkují stabilnější a méně reaktivní H₂O₂ (Lambeth et al., 2007).

Tabulka č. 2: Tkáňová specifita NOX proteinů (Lambeth et al., 2007).

Izoforma	Tkáň s nejvyšším výskytem	Aktivace	Produkce
NOX1	Tlusté střevo, hladké svalstvo cév	Regulace NOXO1, NOXA1, Rac1	O ₂ ^{-*}
NOX2	Fagocyty	Regulace p40 ^{phox} , p47 ^{phox} , p67 ^{phox} , Rac1/2	O ₂ ^{-*}
NOX3	Vnitřní ucho	Regulace NOXO1	O ₂ ^{-*}
NOX4	Ledviny, endotel cév, hladké svalstvo cév, pankreas	Konstitutivně aktivní	H ₂ O ₂
NOX5	slezina, varlata, hladké svalstvo cév	Regulace Ca ²⁺ , fosforylací	O ₂ ^{-*}
DUOX1 a DUOX2	Štítná žláza, plíce, pankreas, placenta, prostata, slinné žlázy	Regulace Ca ²⁺	H ₂ O ₂

NOX1 se vyskytuje zejména v tlustém střevě, prostatě, hladkém svalstvu cév (Suh et al., 1999) a také ve štítné žláze plodu (Kikuchi et al., 2000). NOX3 se nevyskytuje v dospělých tkáních (s výjimkou některých nádorů) (Kikuchi et al., 2000). Najdeme ji v ledvinách plodu (Kikuchi et al., 2000) a ve vnitřním uchu (Paffenholz et al., 2004). Konstitutivně aktivní NOX4 produkuje H_2O_2 jako signál přítomnosti glukózy/ O_2 v endoteliálních buňkách plic, ledvinách, tuku a pankreatu (Wang et al., 1996; Geiszt et al., 2000; Mahadev et al., 2004). NOX5 se vyskytuje ve spermatocytech, slezině a lymfatických uzlinách. Funguje zde jako senzor Ca^{2+} iontů (Bánfi et al., 2001). Další z rodiny NADPH oxidáz jsou DUOX 1 a 2. Jsou podobně jako NOX5 regulovány Ca^{2+} skrze dva EF-hand motivy na N konci. Vyskytují se ve štítné žláze, kde se podílejí na metabolismu jódu a tvorbě tyroxinu (Dupuy et al., 1999).

NOX se vyskytují zejména v oblastech cytoplazmatické membrány s vysokým množstvím kaveolinu a ve fokálních adhezích (Hilenski et al., 2003). NOX2 je v lidských LO na membránách sekrečních granúl s inzulinem, endosomů a lyzozomů (Li et al., 2012). NOX4 byla v hladkém svalstvu a endotelu na rozdíl od ostatních izoform potvrzena nejen na cytoplazmatické membráně a váčcích, ale také na membráně ER, mitochondrií (Block et al., 2009) a na jaderné membráně (Hilenski et al., 2003; Wang et al., 2018). Pravděpodobně se podobně lokalizovaná nachází také v β buňkách LO.

NOX4 hraje v endotelu a tukové tkáni důležitou roli v jejich nakládání s kyslíkem a glukózou. Proto není vhodné pracovat při výzkumu metabolismu s celoorganismálními KO NOX4 zvířaty. Například v adipocytech (zjištěno konkrétně na linii myších buněk s označením 3T3-L1) obsahuje signální dráha vedoucí od IR k příjmu glukózy aktivaci NOX4 a její produkci H_2O_2 (Mahadev et al., 2004). Vyřazení NOX4 tak může vyvolat inzulinovou rezistenci v tuku, což zásadně ovlivní správnou fyziologii. NOX4 funguje jako senzor hladiny O_2 v tzv. pulmonárních neuroepiteliálních tělíscích plic (NEB buňky, z angl. *pulmonary neuroepithelial bodies*) (Wang et al., 1996) a v ledvinách, kde se podílí na regulaci syntézy erythropoetinu (Geiszt et al., 2000). Je nejčastější NOX v lidském plicním endotelu, kde se spolu s NOX2 účastní hyperoxií vyvolané migrace endoteliálních buněk (Pendyala et al., 2009).

2.5.5.2 Úloha NOX v inzulinové sekreci

NADPH oxidázy hrají roli v odpovědi buňky na glukózu a ovlivňují genovou expresi (Morgan et al., 2009). Jedna z jejich možných rolí je snížení výlevu inzulinu při hypoglykémii a zabránění dalšího poklesu glykémie při hladovění (Munhoz et al., 2016). Po zvýšení glykémie dojde k nárůstu koncentrace NADPH v cytoplazmě, která má za následek nárůst produkce ROS z NOX a současně se také zvyšuje aktivita antioxidačních enzymů Prdx/Trx, GPx. Nárůst ROS a jejich degradace je důležitá pro kontinuální výlev sekrečních váčků (Munhoz et al., 2016). NOX2 se podle všeho neúčastní hyperglykemií způsobeného oxidačního stresu v β buňkách (Souza et al., 2017). Má na GSIS pravděpodobně inhibiční vliv. ROS z NOX2 inaktivují proteinkinázu A (PAK, cAMP aktivovaná kináza) a snižují tak signál k sekreci inzulinu (Li et al., 2012; Souza et al., 2017).

Vzhledem k nedostatku pokusů se specifickou delecí NOX4 pouze v β buňkách jmenuji alespoň některé ze zajímavých výsledků s NOX4 inhibitory. Dle výsledků na BRIN-BD11 potkaních β buňkách se zdá, že H_2O_2 z NOX4 se účastní bazálního výlevu inzulinu díky účinkům objemem regulovaného aniontového kanálu (VRAC, z angl. *volume-regulated anion channel*) (Crutzen et al., 2011). Při specifické inhibici NOX4 plumbaginem (bioaktivním rostlinným derivátem (Ding et al., 2010)), nebo snížením exprese *Nox4* betulinovou kyselinou (Steinkamp-Fenske et al., 2007) se výrazně snižuje bazální výlev inzulinu (1,1 až 2,8 mM glukóza) (Crutzen et al., 2011). Při bazálních hodnotách glykémie dochází ke konstitutivní produkci H_2O_2 z NOX4, aktivaci VRAC, depolarizaci membrány, otevření napětově-řízených Ca^{2+} kanálů L-typu a k výlevu sekrečních váčků s inzulinem (Crutzen et al., 2011). Na základě pokusů s inhibitory NOX4 s označením GLX351322 a GKT136901 víme, že NOX4 podporuje správný průběh GSIS po akutním zvýšení glykémie (Anvari et al., 2015). Inhibice NOX4 vede k poklesu výlevu inzulinu na popud glukózy, nebo palmitátu z myších LO po krátkodobé expozici (Anvari et al., 2015). Další selektivní inhibitor NOX4 s označením GLX7013114 účinně snižuje míru apoptózy buněk lidských LO vyvolanou působením cytokinů IL1 β , interferonem γ (IFN γ) a glukolipotoxicitou. Při použití na kultuře β buněk účinně snižuje celkovou produkci ROS v cytoplazmě (Wang et al., 2018).

2.6 Základní cesty antioxidantace

Každá eukaryotická buňka je vybavena několika základními mechanismy, jak se vypořádat s produkcí ROS ve svém metabolismu. Hladina nejznámějších antioxidantních enzymů je u β buněk LO poměrně nízká (Grankvist et al., 1981), což je dle teorie „*bezbranné β buňky*“ důvodem rozvoje T1DM a T2DM v hyperglykemických a lipotoxických podmínkách. Také to ovšem dokazuje důležitou roli ROS a redoxních signalizací pro správnou funkci β buněk. Zdá se, že β buňky mají antioxidantní obranu plně dostačující k vypořádání s fyziologickými hladinami ROS. Někteří také tvrdí, že exprese mitochondriální Mn-SOD je v porovnání s játry sice o 70-60 % nižší (Lenzen et al., 1996; Tiedge et al., 1997), množství mitochondrií je ovšem oproti hepatocytům v β buňkách zhruba pětina dle propočtů (Lenzen, 2017 na základě studie Dean, 1973) a tak celkový obsah Mn-SOD v mitochondriích β buněk naopak převyšuje koncentraci Mn-SOD v jaterních mitochondriích. Umožňuje jim tak dostatečnou antioxidantaci i za zvýšené produkce ROS z ETC (Lenzen, 2017).

Snížená je proti jaterním buňkám o 60-70 % exprese cytoplazmatické Cu/Zn-SOD, o 95-85 % je snížena exprese GPx1 a exprese kataláz v LO byla naprosto minimální, či nebyla zaznamenána vůbec (Lenzen et al., 1996; Tiedge et al., 1997). β buňky ovšem obsahují enzym Prdx, který účinně přeměňuje H_2O_2 na neškodnou molekulu vody. Prdx patří mezi H_2O_2 destruuující enzymy s vysokou afinitou, avšak je substrátem snadno inaktivován. Isoformy jsou charakteristické pro jednotlivé kompartmenty buňky, např. Prdx1 a Prdx2 se vyskytují v cytosolu, Prdx3 v mitochondriích, Prdx4 v ER a Prdx5 v peroxizomech (Lenzen, 2017). Jsou regenerovány pomocí systému Trx a TrxRd, a tato regenerace je závislá na

přítomnosti NADPH. Díky své vysoké afinitě k H_2O_2 slouží Prdx s Trx jako lokální senzor druhého posla H_2O_2 (Rhee et al., 2012).

Snížené množství kataláz a GPx1 umožňuje roli Prdx/Trx/TrxRd systému v antioxidační obraně a v redoxní signalizaci po příjmu glukózy a GSIS (Roma & Jonas, 2019). Nízká glykémie znamená snížení produkce NADPH, úbytek substrátu pro NOX i Prdx/Trx/TrxRd systém a umlčení jejich signalizace. Naopak zvýšení NADPH přímo vede k aktivaci NOX i Prdx, které předávají informace o zvýšení glykémie dále do buňky. Po reakci s H_2O_2 je oxidovaný Prdx reoxidován Trx za spotřeby NADPH, nebo se Prdx redukuje oxidací thiolových skupin jiného substrátu v duchu tzv. *redox relays* (Delaunay et al., 2002). To umožňuje buňce mít větší kontrolu nad cílenou oxidací a přenosem redoxního signálu. Místo nespecifické reakce s H_2O_2 umožňuje antioxidační enzym cílenou tvorbu disulfidických můstků například v regulačním místě transkripčních faktorů (Delaunay et al., 2002). Na potvrzení „redox relays“ v β buňkách ovšem ještě musíme počkat (Roma & Jonas, 2019). Tuto teorii podporuje fakt, že glukóza zde reguluje expresi inhibitoru TRXNIP. Vazbou na Trx TRXNIP snižuje antioxidační obranu a signalizační dráhu Prdx/Trx. Glukotoxicita při T2DM tak vede k narušení fyziologických ROS signalizací díky inhibici cytoplazmatické Trx1 a mitochondriální Trx2 TRXNIP (Chen et al., 2008), k poruše průběhu GSIS a rozvoji T2DM. Expresí genu pro protein TRXNIP závisí na hladinách transkripčních faktorů rodiny CHREBP (z angl. *carbohydrate-responsive element-binding protein*), které jsou aktivované na základě hladin glukózy a jsou důležité pro správnou proliferaci a funkci β buněk (Zhang et al., 2015). Výčet přítomných antioxidačních enzymů v β buňkách shrnuje následující tabulka č. 3.

Tabulka č. 3: Antioxidační enzymy β buněk a jejich lokalizace

Zpracováno dle předlohy a informací od Lenzen, 2017 a Roma & Jonas, 2019

<u>Zkratka</u>	<u>lokalizace</u>	<u>cílová molekula</u>
Cu/Zn-SOD (1)	cytosol, mitochondriální mezi-membránový prostor, peroxizomy, jádro	$\text{O}_2^{\bullet-} \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2$
Mn-SOD (2)	mitochondriální matrix	$\text{O}_2^{\bullet-} \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2$
Cu/Zn-SOD (3)	extracelulární prostor	$\text{O}_2^{\bullet-} \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2$
Kataláza	cytosol, peroxisomy	$\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{H}_2\text{O}$
GPx1	cytosol, peroxisomy*	$\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{H}_2\text{O}$
GPx7/8	ER**	$\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{H}_2\text{O}$
PRDX1/2/6	cytosol	$\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{H}_2\text{O}$
PRDX4	ER***	$\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{H}_2\text{O}$
PRDX3	mitochondrie	$\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{H}_2\text{O}$
PRDX5	peroxizomy	$\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{H}_2\text{O}$

*lokalizace zde pouze u hlodavců a ne u lidí, **lokalizace zde pouze u lidí, ***u hlodavců v nižší míře

K recyklaci thiolových skupin antioxidantních enzymů spotřebovávajících H_2O_2 slouží Trx a glutaredoxiny (Grx). Trx1 redukuje disulfidické můstky u Prdx a thioredoxin-závislých peroxid reduktáz v cytosolu a Trx2 v mitochondriích β buněk. Reoxidaci Trx mají za úkol TrxRd, které využívají NADPH z PPP cyklu (Kalinina et al., 2008). Grx1 redukuje disulfidy v cytosolu, Grx2 a Grx5 v mitochondriích. K jejich regeneraci slouží systém glutathionu (GSH) a pomocné glutathion reduktázy (GSRd), která za spotřeby NADPH regeneruje GSH (Stancill et al., 2019).

Inhibicí drah produkujících NADPH v β buňkách dochází k porušení průběhu GSIS a nárůstu oxidativního stresu (Roma & Jonas, 2019). NADPH vzniká v PPP cyklu, v reakci isocitrát dehydrogenázy 1 (IDH1, v mitochondriích IDH2), malát dehydrogenázy 1 (ME1, z angl. *malic enzyme 1*, v mitochondriích ME2 a ME3) a nikotinamide nukleotide transhydrogenázy (NNT) v mitochondriích. NNT umožňuje obousměrný chod v závislosti na přítomnosti NADPH/NADH (Santos et al., 2017).

GSH je syntetizován v cytosolu a transportován skrz specifické přenašeče v této redukované formě do cílových míst (Griffith & Meister, 1985). Přirozeně se tak objevuje nerovnováha mezi GSH/GSSG, např. v mitochondriální matrix.

2.7 Signalizační role ROS ve vývoji, zrání a funkci β buněk

ROS mohou ve vysokých dávkách způsobovat oxidativní poškození. V nízkých koncentracích ovšem patří ROS a zejména H_2O_2 k MCF, které pozitivně ovlivňují průběh GSIS (Pi et al., 2007). Mohou totiž přímo ovlivňovat blízké citlivé molekuly, či působit jako druzí posli výše popsáným mechanismem „redox relay“ (Schreck & Baeuerle, 1991).

Do GSIS jsou zapojeny mnohé proteiny senzitivní k oxidačně-redukčním změnám, např. sarkoplazmatická Ca^{2+} ATPáza (SERCA), RyR2 (Llanos et al., 2015) a inositol trifosfátový receptor (IP_3R), které po přímé stimulaci H_2O_2 umožňují vyšší výlev sekrečních váčků v GSIS (Llanos et al., 2015). Endogenní H_2O_2 ovlivňují GSIS pravděpodobně také skrze účinky na teplotně senzitivní Ca^{2+} kanál TRPM2 (z angl. *transient receptor potential melastatin 2*) na β buněčné membráně (Koshio & Tominaga, 2015). Ten je regulován změnou teploty, která díky nárůstu mitochondriálního metabolismu stoupá při GSIS (Gylfe & Hellman, 1975).

V mnoha buněčných typech aktivuje H_2O_2 signální dráhy vedoucí k buněčnému dělení a růstu (Timblin et al., 1995), diferenciaci (Li et al., 2006) nebo buněčné smrti (skrz aktivaci JNK/c-JUN) (Lin et al., 2004). ROS samostatně nebo zprostředkovaně aktivují např. mitogeny aktivovanou proteinkinázovou dráhu (MAPK) (Sundaresan et al., 1995) a také fosfolipázu A2 (Zor et al., 1993). Působí naopak inhibičně na proteintyrosinfosfatázy (Zor et al., 1993). Díky variabilní citlivosti cílových molekul a signálních drah je působení ROS rozmanité a jejich různé působení je nutno v β buňkách podrobit dalšímu zkoumání. Například v srdci ROS působí v závislosti na dávce. Při nízkých koncentracích (okolo 10-30 μM) způsobují zvýšenou proteosyntézu a hypertrofii kardiomyocytů

aktivací ERK1/2 dráhy (ovšem ne JNK, p38 nebo Akt). Při zvyšující se dávce (100-200 μM) vede k apoptóze skrze aktivaci JNK, p38 kinázy a Akt a ERK1/2, vyšší dávky (300-1000 μM) jsou již nekrotizující (Kwon et al., 2003).

Na ROS jsou závislé také mnohé transkripční faktory, např. nukleární faktor kappa B (NF- κ B) (Schreck & Baeuerle, 1991), aktivátorový protein 1 (AP1, heterodimer Fox a Jun proteinu) (Lo & Cruz, 1995) a p53 (Hainaut & Milner, 1993). Tyto aktivace jsou ovšem spíše zapojené při nadměrné tvorbě ROS vedoucí k buněčnému poškození.

K regulaci exprese genů zapojených do antioxidační obrany, a tak tedy i k ovlivnění redoxních signalizací, slouží dráha Nrf2/Keap1. Konkrétně se jedná, např. o glutathion-S-transferázu A2, SOD1, NADPH quinone oxidoreduktázu, GPx, glutathion syntázu a další (Wasserman & Fahl, 1997; Ishii et al., 2000). V období bez oxidačního stresu je transkripční faktor Nrf2 vázán v cytoplazmě na represor Keap1, je ubiquitinován a degradován v proteazomu. Pokud dojde k redoxním změnám, jsou modifikovány cysteiny u redoxně senzitivního Keap1 a Nrf2 se uvolňuje (McMahon et al., 2003). Putuje do jádra, kde plní funkci TF na promotoru regionu ARE (z angl. *antioxidant response element*) (Itoh et al., 1997). Aktivní Nrf2/Keap1 dráha snižuje zánětlivou odpověď NF- κ B dráhy navozenou cytokiny IL1 β a IFN γ (Song et al., 2009).

2.8 Glukotoxicita a glukolipotoxicita

Akutní zvýšení glykémie má krátkodobě vliv na aktivitu antioxidačních enzymů. Již za 5,6 mM glukózy stoupá aktivita GPx 2,7krát (další navýšení glykémie nevede ke zvýšení) (Oliveira et al., 1999). U Cu/Zn-SOD dochází akutně ke stimulaci aktivity glukózou lineárně od 5,6 mM po 16,7 mM glukózy. Její aktivita přímo koreluje s výlevem inzulinu při GSIS (Oliveira et al., 1999), čímž reguluje hladinu ROS při akutně zvýšené glykémii. Dlouhodobá hyperglykémie, která působí na β buňky toxicky, však vede ke ztrátě tohoto mechanismu (Tiedge et al., 1997) a nestimuluje zvýšení genové exprese antioxidačních enzymů (Tiedge et al., 1997).

Při déletrvající hyperglykémii produkce ROS v mitochondriích razantně stoupá. Tyto ROS (H_2O_2) a vysoká glukóza inhibují první fázi GSIS snížením aktivity GA3PDH (Sakai et al., 2003). Vysoká glykémie také snižuje aktivitu a genovou expresi glukóza-6-fosfát dehydrogenázy (G6PDH) (Zhank et al., 2010). G6PDH je důležitým enzymem PPP dráhy, jehož reakce produkuje NADPH a ribózu-6-fosfát pro syntézu nukleotidů. Ačkoli existují i další cesty produkce NADPH, PPP dráha je nejdůležitějším zdrojem pro antioxidační enzymy (Pandolfi et al., 1995) a pravděpodobně i pro NOX4. Snížení hladiny G6PDH způsobí nedostatek antioxidačních enzymů a nárůst oxidačního stresu zejména z mitochondrií a ER, narušení GSIS, a může vést až k apoptóze β buněk (Pandolfi et al., 1995; Zhank et al., 2010). Myši deficitní v genu pro G6PDH mají menší LO a narušenou GSIS (Zhank et al., 2010).

2.8.1 Glukolipotoxicita

Při nadměrném společném působení glukózy a volných mastných kyselin mluvíme o takzvané glukolipotoxicitě, která vede ke snížení inzulínové sekrece a je častá u diabetických pacientů. Glukolipotoxicita obecně u β buněk vede k progresi DM, způsobuje zvýšení oxidačního stresu, ER stresu, apoptózu a poruchy dynamiky iontů a mitochondriálního metabolismu. Mění se genová exprese, produkce cytokinů a aktivita mnohých enzymů. Konkrétní molekulární mechanismy glukolipotoxicity zahrnují snížení citlivosti enzymů mitochondriální oxidativní fosforylace a zvýšení produkce ROS (Barlow & Affourtit, 2013). Jak se zdá, při glukolipotoxických podmínkách u DM pacientů ubývá množství SNARE proteinů zapojených do výlevu váčků s inzulinem (Ostenson et al., 2006). Nejvýraznější celkový úbytek proteinů byl pozorován u Syntaxinu-1A ($21 \pm 5\%$), SNAP-25 ($12 \pm 4\%$), Munc18 ($34 \pm 13\%$) a synaptophysinu ($34 \pm 7\%$). Obdobné změny hladiny mRNA pro tyto proteiny byly zjištěny při kvantitativní PCR (Ostenson et al., 2006). Stejně výsledky lze sledovat u potkaního modelu (Nagamatsu et al., 1999) a INS-1E β buněk (Dubois et al., 2007). U INS-1E linie v glukolipotoxických podmínkách s porušenou GSIS byl pozorován úbytek množství SNARE proteinů VAMP-2 (v-SNARE), syntaxinu 1 a komplexinu (Dubois et al., 2007). Dle výsledků týmu profesorky Drewsové za negativní účinky glukolipotoxicity nemůže zvýšení produkce ROS, ale jde o snížení mitochondriální tvorby ATP. Následný nedostatek energie dle jejich názoru vede k poklesu tvorby inzulinu a také výlevu sekrečních granul (Oquendo et al., 2018). Jistě jde o kombinaci těchto hlavních dvou mechanismů.

Při zvýšené hladině glukózy a současně MK se Acyl-CoA s dlouhými řetězci hromadí v cytoplazmě kvůli inhibici karnitin-palmitoyl transferázy 1 (McGarry & Foster, 1979), což vede k ovlivnění citlivosti buňky na glukózu a snížení GSIS. Glukolipotoxicita za to může mimo již dříve popsanych mechanismů skrze snížení transkripce Pdx1 (Gremlich et al., 1997).

2.8.2 Glukotoxická

Dlouhodobě zvýšená glykémie způsobená poruchou β buněk či rozvinutou inzulínovou rezistencí vede k poškození citlivých tkání. Jedná se zejména o nervový systém, oční sítnici, ledviny a samotné β buňky. Panuje všeobecný názor, že u β buněk je hlavním mechanismem poškození nárůst oxidačního stresu vlivem produkce ROS při zvýšeném metabolismu (Robertson, 2004) a produkce zánětlivých IL1 β , na které mají β buňky hojný počet receptorů (Boni-Schnetzler et al., 2008). Na roli ROS poukazuje pozitivní vliv antioxidantů a antioxidačních enzymů v glukotoxických podmínkách (Kaneto et al., 1999). Glukotoxická vede u β buněk ke snížení vazby transkripčních faktorů PDX1 a MAFA na promotor inzulínového genu (Tanaka et al., 1999). MAFA je považován za nejdůležitější TF genu inzulinu (Sharma et al., 1995). Pravděpodobně jde o cílovou molekulu narušené redoxní rovnováhy β buněk. Za glukotoxických podmínek dochází k jeho delokalizaci z jádra do cytoplazmy (Harmon et al., 2009), kde je degradován v proteasomu (Harmon et al., 2005). Jeho delokalizaci a destrukci při hyperglykémii lze

zabránit zvýšením hladiny antioxidačního enzymu GPx (Harmon et al., 2009), který reaguje s H₂O₂ a radikály lipidů.

3. Seznam chemikálií a roztoků

Základní chemikálie a roztoky

ATB: Penicilin-Streptomycin (P0781)	Sigma, USA
Fetal Bovine Serum (FBS) Qualified (FB-1090/500)	Biosera
RNAiMAX (Lipofectamin) 13778-150	Invitrogen by Thermo Fisher Scientific
Opti-MEM (11058-021)	Gibco, UK
Lipofectamine 2000	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific
Bovine Serum Albumin (BSA, A3912)	Sigma, USA
2-Mercaptoethanol (63689)	Sigma, USA
Tween 20 (P1379)	Sigma, USA
Immobilon Forte Western HRP Substrate (WBLUF0500)	SigmaAldrich
Rybí želatina (G7041)	Sigma, USA
Normal Donkey serum 017-000-121, 60 mg/ml	Jackson Immuno Research Lab. INC
Akrylamid 30%	Bio rad
Transferový pufr: 10x Tris/Glycine Buffer for Western Blots and Native Gels (#1610771)	Bio rad
Elektrodový pufr: 10x Tris/Glycine/SDS (#1610732)	Bio rad
TEMED (1610800)	Bio rad

Anestetika a roztoky pro histologii

Zoletil	Virbac SA, Carros, Francie
Rometar	Spofa, Česká republika
Gillsův hematoxilin III (105174)	SigmaAldrich
Eosin Y (žlutavý)(115935)	SigmaAldrich

Protilátky na imunocytochemii

Název:	Výrobce:	Použité ředění:
Anti-insulin antibody (ab46716) rabbit	Abcam	1:2000
Anti-glucagon antibody (ab10988) mouse	Abcam	1:500
Donkey anti-mouse IgG (H+L) ReadyProbes Secondary Antibody, Alexa Fluor 488 (R37114)	Invitrogen, ThermoFisher Scientific	1:1000
Donkey anti-rabbit IgG (H+L), Alexa Fluor 488 (ab150073)	Abcam	1:1000
Donkey anti-Rabbit IgG (H+L), Alexa Fluor 488 (A-21206)	Invitrogen, ThermoFisher Scientific	1:1000
Donkey anti-Rabbit IgG (H+L) Highly Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 647 (A-31573)	Invitrogen, ThermoFisher Scientific	1:1000
Donkey anti-Mouse IgG (H+L) Highly Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 647 (A31571)	Invitrogen, ThermoFisher Scientific	1:1000

Protilátky a další látky na Western blot

Název:	Výrobce:	Použité ředění:
Anti-βactin antibody (ab5441) mouse	Invitrogen, ThermoFisher Scientific	1:1000
Anti-NOX4 antibody (ab133303) rabbit	Abcam	1:6000
Goat anti-Mouse IgG (H+L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody, HRP (31432)	Invitrogen, ThermoFisher Scientific	1:10000
Goat Anti-Rabbit IgG (H+L)-HRP Conjugate Secondary antibody (170-6515)	Bio rad	1:10000
Precision Plus Protein™ Dual Color Standards; Bio-RAD; #161-0374	Bio rad	-

Kity a soupravy

Rat Insulin High Sensitivity ELISA (RAI006R)	BioVendor
Mercodia Rat/Mouse Proinsulin ELISA (10-1232-01)	Mercodia
RNeasy Protect Mini Kit (74124, 74104)	Qiagen
Pierce™ BCA Protein Assay Reagent A (23223)	Thermo Fisher Scientific
West Femto substrát křenové peroxidázy (34096)	Thermo Fisher Scientific

SiRNA a expresní plazmidy

Dvojice siRNA proti krysí NOX4 (exony 14 a 10)	Thermo Fisher Scientific
Si1 5' – CCGUUUGCAUCGAUACUAATT	
Si2 5' – CAUUAUCUCAGUAAUCAAUTT	
Scramble (SCR), MISSION siRNA universal negative control #1 (SIC001)	Sigma-Aldrich
PLAZ OVER mouse <i>Nox4</i> pcDNA3.1-mNox4 (#69353)	Addgene
Plazmid RC3300	Addgene

Primery a enzymy RT-PCR

Beta Aktin Reverse 2 primer (BA R2)	Sigma, USA
5' – ACGCAGCTCAGTAACAGTCC	
Beta Aktin Forward 2 primer (BA F2)	Sigma, USA
5' – GATCAAGATCATTGCTCCTCCTG	
NOX4 Reverse primer (212)	Sigma, USA
5' – GCAGCTACATGCACACCTGA	
NOX4 Forward primer (212)	Sigma, USA
5' – GGGCGATTGTGTTGAGCAG	
MafA Reverse primer (4095)	Metabion international AG
5' – CCGTCCAACCGCCTCATTAC	
MafA Forward primer (4095)	Metabion international AG
5' – AGTACCACCGCTATCCCGAG	
Pdx Reverse primer (4057)	Metabion international AG
5' – CTCCGGTTCTGCTGCGTATG	
Pdx Forward primer (4057)	Metabion international AG
5' – CCGCGTTCATCTCCCTTTCC	

Pcsk1 Reverse (Pc1) primer (4095)	Metabion international AG
5' – CCGCCCATATCACACGATCA	
Pcsk1 Forward (Pc1) primer (4095)	Metabion international AG
5' – TCGGTTTGGTGTGCACTGA	
Pcsk2 Reverse (Pc2) primer (4095)	Metabion international AG
5' – GGGTCAGTACCAACTTGCCG	
Pcsk2 Forward (Pc2) primer (4095)	Metabion international AG
5' – GATGCAGGTGCCATGGTGAA	
Cpe Reverse primer (209)	Metabion international AG
5' – CCGTCCAACCGCCTCATTAC	
Cpe Forward primer (209)	Metabion international AG
5' – AGTACCACCGCTATCCCGAG	
Ins1 Reverse primer (100)	Metabion international AG
5' – CAACCTCCAGTGCCAAGGTC	
Ins1 Forward primer (100)	Metabion international AG
5' – CCCAAGTCCCGTCGTGAAGT	
Ins2 Reverse primer (160)	Metabion international AG
5' – TTCCACCAAGTGAGAACCACAA	
Ins2 Forward primer (160)	Metabion international AG
5' – GTGACCAGCTACAGTCGGAA	
DNase I, RNase-free (EN0525)	Thermo Fisher Scientific
Reverzní transkriptáza a její pufr: GrandScript cDNA synthesis kit (A103b)	TATAA Biocenter
EvaGreen Dye, 10X in Water (31000)	Biotium
Forget-Me-Not 40X Template Buffer (cat. 99802)	Biotium

POUŽITÁ MÉDIA a roztoky

INS zásobní médium

	Koncentrace zásobního roztoku	Koncentrace finální	Do objemu 1000 ml
TK voda (dH ₂ O)	-	-	638 ml
RPMI (bez glukózy)	5x koncentrovaný	1x	200 ml
Glutamin	200 mM / 3%	2 mM/ 0,03%	10 ml
Pyruvát sodný	100 mM	1 mM	10 ml
NaHCO ₃	7,5%	0,2%	27 ml
HEPES	1M	10mM	10 ml
Mercaptoethanol	100%	0,0000035%	3,5 µl

Kompletní 11mM INS médium

Glukóza	250mM	11mM	44 ml
ATB (penicilin-streptomycin)	100x	1x	10 ml
FBS	100%	5%	50 ml
Zásobní médium			896 ml

Médium 11mM bez ATB

Glukóza	250mM	11mM	44 ml
FBS	100%	5%	50 ml
Zásobní médium			906 ml

RIPA lyzační buffer

přísada	koncentrace	Do 100 ml
NaCl	150 mM	0,8766 g
Tris base	50 mM	0,6057 g
Triton	1%	1 g/ 1 ml
SDS	0,1%	0,1 g
Sodium deoxycholat	0,5 %	0,5 g

+ HCl = > pH 7

+ 10 % glycerol

Příprava TRIS pH 6,8 roztoku:

Rozpustíme v kádince 12,1 g Tris (base) v 60 ml dH₂O, upravíme pH na 6,8 pomocí HCl a doplníme na 200 ml dH₂O. Roztok přefiltrujeme a přidáme 0,8 g SDS. Rozpustíme a uchovááme v lednici.

Příprava TRIS pH 8,8 roztoku:

Rozpustíme 45,5 g Tris (base) v 150 ml dH₂O. pH upravíme na 8,8 pomocí HCl. Doplníme roztok dH₂O do 250 ml a přefiltrujeme přes filtrační papír. Přidáme 1 g SDS, rozpustíme a uchovááme v lednici.

Složení HF diety ssniff® EF acc. D12492 (I) mod.

Experimentální HFD poskytovala myším 54-60 % energie z tuků, 21-22 % ze sacharidů a 19-24 % z proteinů. Obsahovala 265 mg/kg cholesterolu a přesné množství esenciálních aminokyselin, minerálů a vitaminů. Díky vysokému obsahu tuků a nasycených MK, tato dieta vede k obezitě a vývoji T2DM. Přesné složení HFD je k dispozici v katalogu výrobce ssniff® EF Spezialdiäten GmbH (produktové číslo E15742-34).

4. Použité přístroje

Countess™ automated cell counter	Invitrogen
MSC advantage laminární box	Thermo Scientific
SW22 shaking water bath	Julabo
Light Cycler 480 real-time PCR	Roche
NanoDrop™ One Microvolume UV-Vis Spectrophotometer	Thermo Scientific
Sigma 3-18 K centrifuge	Sigma
Eppendorf centrifuge 5427 R	Eppendorf
Eppendorf centrifuge 5417 R	Eppendorf
CO ₂ Incubator Innova Co-170	New Brunswick
Combi-spin FVL2400N, mini centrifuge/vortex	Biosan
Elpan laboratory shaker type 358 S	Elpan
Mixing block MB-102	Bioer
Shel Lab shaking incubator	Shel Lab
Pipety eppendorf reference	Eppendorf
Pipety Nichiryo nichipet EX	Nichiryo
Konfokální mikroskop Leica SPE (Leica DM 2500 CSQ V-VIS)	Leica
ChemiDoc	Bio rad
TP1020 Semi-enclosed Benchtop Tissue Processor	Leica

5. Metodiky

Práce s buněčnou linií INS1E – charakteristika

Buňky INS-1E (RRID:CVCL_0351, (SIB, 2019)) jsou teplotně senzitivní a proto jejich kultivace probíhá při teplotě 37 °C v inkubátoru se stálou 5% CO₂ atmosférou. Uchovávají se v kultivačních lahvích o třech základních velikostech: 25 cm², 75 cm² a 175 cm². Optimální podmínky jim zajišťuje INS-1E médium (složení kompletního 11mM INS média viz. Seznam chemikálií a roztoků). Byly vytvořeny selekcí rentgenovým zářením z mateřské linie INS-1, vzniklé z nádoru β buněk LO u *Rattus norvegicus* (potkana) (NCBI Taxonomy: 10116) (SIB, 2019). Pracovali jsme vždy s buňkami v pasážích od 5. do maximálně 12. pasáže.

Transfekce plazmidem s myším NOX4 či kontrolním RC3300

Optimální počet buněk byl nasazen do malé 25 cm² lahve (1,5 milionu buněk) či do jamek šestijamkové destičky (200 – 800 tisíc buněk). Následující den byla vytvořena reakční směs dle rozpisu v následující tabulce:

Do 1. mikrozkušky:	Malá lahev ↓:	šestijamková destička ↓:
Lipofectamin 2000	5 µl	2 µl
Opti-MEM	625 µl	250 µl

Proběhla 5minutová inkubace při pokojové teplotě.

Do 2. mikrozkušky:	Malá lahev ↓:		šestijamková destička ↓:	
DNA plasmidu (1 ug/1 ul)	NOX4	RC3300	NOX4	RC3300
	5 µl	5 µl	2 µl	2 µl
Opti-MEM	625 µl		250 µl	

Obsah příslušných mikrozkušek byl přenesen do 1 mikrozkušky. Došlo k 20minutové inkubaci při pokojové teplotě (RT, z angl. *room temperature*). Následně bylo od buněk odsáto médium, nahrazeno ohřátým médiem bez antibiotik (ATB) dle tabulky a přidala se také inkubovaná reakční směs.

INS médium 11mM bez ATB	3,75 ml	1,5 ml
-------------------------	---------	--------

Buňky byly uloženy do inkubátoru (37 °C) na dalších 24 hodin. Následně jim bylo vyměněno médium za čerstvé INS-1E médium s ATB. Čtvrtý den proběhl pokus a odběr vzorku.

Silencing siRNA (SiNOX4) a kontrola scramble (SCR)

Do malé 25 cm² lahve či do jamek šestijamkové destičky byl nasazen adekvátní počet INS-1E buněk (1-1,5 milionu buněk do malé lahvičky/ 200-800 tisíc buněk do šestijamkové destičky). Druhého dne byla vytvořena reakční směs dle následující tabulky:

Do 1. mikrozkušky:	Malá lahev ↓:	šestijamková destička ↓:
RNAiMAX	12,5 µl	5 µl
Opti-MEM	250 µl	100 µl

Proběhla 5minutová inkubace při pokojové teplotě.

Do 2. mikrozkušavky:	Malá lahev ↓:		šestijamková destička ↓:	
siRNA (20 μM)	siRNA	SCR	siRNA	SCR
	7,5 μl (Si1)	15 μl (SCR)	3 μl (Si1)	6 μl (SCR)
	+7,5 μl (Si2)		+ 3 μl (Si2)	
Opti-MEM	250 μl		100 μl	

Obsah příslušných mikrozkušavek byl přenesen do 1 mikrozkušavky. Došlo k 20minutové inkubaci při RT. Následně bylo od buněk odsáto médium, nahrazeno ohřátým opti-MEMem dle tabulky a přidala se také inkubovaná reakční směs.

Opti-MEM	1000 ul	400 ul
----------	---------	--------

Buňky byly ponechány 1 hodinu v inkubátoru (37 °C). Po hodině bylo přidáno 2,5 ml čerstvého teplého INS-1E média k malé lahvičce a 1 ml média do jamky v šestijamkové destičce. Následující den byla směs vyměněna za běžné INS-1E médium. Čtvrtého dne proběhl pokus a odběr vzorku.

Myši C57BL6/J (WT) a β buněčně-specifický KO NOX4^{-/-} model (MUT)

Knockout (KO) myši se specifickou delecí NOX4 v β buňkách (MUT) byly vytvořeny v naší laboratoři Mitochondriální fyziologie na ústavu Akademie věd České republiky (AVČR) ve spolupráci s ústavem Molekulární genetiky spadajícím pod centrum Biocev. MUT byla vytvořena křížením NOX4Flox/Flox myši (od Prof. Brandese z J.W.Goethe University, Frankfurt, Německo) a B6(Cg)-Ins2tm1.1(cre)Thor/J myši (zakoupenou z The Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine, USA). Genotypizací nalezená kongenní NOX4 β buněčně specifická KO myš byla nazvána B6.Cg-Nox4^{tm1Ams}>Tg(Ins2-cre)25Mgn myš. Kontrolní myš (NOX4^{+/+}, Cre^{-/-}) tzv. *wildtype* (WT) byla získána zpětným křížením NOX4 β specifické KO myši s původní C57BL6/J myší. Chov myší probíhal dle zásad „welfare“ a směrnic Evropské unie o chovu laboratorních zvířat v otevřených chovech (bez bariéry) na Ústavu molekulární genetiky v Praze a v chovných zařízeních Biocevu ve Vestci.

Izolace myších slinivek pro histochemii

Pokusné myši byly uspány anestetikem Zoletil (40 mg/kg, Virbac SA, Carros, Francie) ve směsi s 2% Rometarem (10 mg/kg, Spofa, Česká republika) vpraveným subkutánně-abdominálně. Operativně byl nalezen společný vývod slinivky, žlučníku a dvanáctníku – Vaterova papila. Byla opatrně napíchnuta kapilárou s vlasem, svorkami byl uzavřen jaterní vývod a myš byla usmrcena bezbolestně vykrvením v důsledku prostřížení dolní duté žíly. Pankreas byl naplněn pozvolna 2 ml fyziologického roztoku, izolován od okolní tkáně a přenesen do čisté falkony s 10% pufovaným formalinem.

Příprava histologického preparátu – barvení Eosinem a Hematoxylinem

Izolovaná slinivka byla zbavena vody macerací ve vzestupné řadě alkoholu (přes noc). Následně byla zalita do parafinového bloku a nakrájena mikrotomem na 3-5 nm tenké řezy středem orgánu (ve vzdálenostech cca 1000-1500 μ m od okraje v sekčních řezech po 200 μ m). Ty byly přeneseny na vodní hladinu a následně na podložní sklíčka. Došlo k dosušení v 44-48 °C. Následovala deparafinace (v rozpouštědle xylenu (10 min) a sestupné řadě alkoholů) a zavodnění (5 min). Následně byly vzorky obarveny Gillsoým hematoxylinem (15 min), opláchnuty vodou (5 min) a 2x ponořeny do kyselého alkoholu (200 ml 70% etanol a 2 ml HCl). Následně byly ponořeny do vody (10 min) a do eosinu (3 min).

Po krátkém ponoření do dH₂O následovala vzestupná řada alkoholů, inkubace v karboxylenu (5 min), xylenu (5 min) a montáž pomocí Pertex média s krycím sklem. Po uplynutí více jak 3 hodin bylo možné pozorovat preparát pod mikroskopem.

Stanovení velikosti LO

Histologické řezy byly pozorovány pomocí světelného mikroskopu, LO vyfoceny a fotky analyzovány v programu ImageJ (Fiji, Java). Každý LO byl změřen co do obsahu (μm^2) a rozměru délky a šířky (μm). Na základě velikostí LO u WT na ND byly LO rozděleny do velikostních kategorií malé LO ($< 5000 \mu\text{m}^2$) a velké LO ($> 5000 \mu\text{m}^2$). Dle celkového počtu LO ve slinivce byly počty malých a velkých LO přepočítány na celkové procentuální zastoupení jednotlivých kategorií. Data byla dále analyzována v aplikaci GraphPad Prism 5.

Fixace INS-1E buněk a imunocytochemie

Buňky INS-1E byly prvního dne vysety na šestijamkovou destičku obsahující krycí sklíčko s polylysinem v počtu 200 000 buněk na jamku. Druhý den proběhla transfekce a silencing dle protokolu. Třetí den jim bylo vyměněno médium a čtvrtý den došlo k jejich fixaci 4% paraformaldehydem naředěným v PBS ze zásobního 32% roztoku. Inkubace v paraformaldehydu probíhala v nahřívané kývačce při 37 °C po 15 minut. Následně byly vzorky promyty v PBS a ponechány na 10 minut v 0,35% roztoku TritonuX-100 v PBS.

Ze zafixovaných buněk byl odsán 0,35% TritonX-100 v PBS a buňky byly inkubovány blokačního pufru (celkem na 1 sklo náleží 3433,3 μl PBS, 0,035 g BSA (0,1%), 0,0035 g rybí želatiny (0,01%) a 66,7 μl oslího séra (3%)) na kývačce na nejnižší možný výkon po 1 hodinu. Následně byl vyměněn za čerstvý blokační pufr a s primárními protilátkami proti inzulinu (1: 2000) a glukagonu (1: 500) znovu na 1 hodinu. Poté byly opláchnuty promývacím pufrem (na 1 sklo náleží 5994 μl PBS a 6 μl Tween20). Následovala inkubace v blokačního pufru se sekundárními protilátkou (optimální ředění 1:1000) po 1 hodinu ve tmě. Dále byl zopakován proplach v promývacím pufre na kývačce při vyšších otáčkách. Poslední promývací pufr byl vyměněn za PBS a ze vzorku byl vyroben preparát, či byl rovnou pozorován pod mikroskopem.

Izolace RNA pomocí Rneasy Mini Kit, Qiagen

Od buněk na šestijamkové destičce či v malé kultivační lahvi bylo odsáto médium, byly odděleny od podkladu pomocí trypsinu a reakce byla zastavena přidáním INS-média. Resuspendované buňky byly přeneseny do falkony a stočeny v centrifuze 2 min/ 200 RCF. Následovalo odsání kapaliny a resuspendování peletu v čerstvém PBS a centrifugace 2 min/ 200 RCF. Tento krok byl zopakován. Následně bylo k peletu přidáno 350 μl lyzačního RLT pufru z Rneasy Mini Kitu od firmy Qiagen a 350 μl

70% ethanolu. Vzorky byly přeneseny do RNA kolonky. RNA bylo ze vzorku lyzátu buněk izolována dle protokolu od výrobce. Následně byla změřena celková koncentrace RNA na přístroji NanoDrop.

Ošetření RNA, přepis do cDNA a RT-PCR

Objem izolované RNA odpovídající celkovému množství 2000 ng RNA byl přenesen do čisté mikrozkušavky spolu se 2 μ l enzymu DNázy, 2 μ l pufru DNázy (10x koncentrovaného) a odpovídajícího množství dH₂O (bez RNáz) do celkového objemu 20 μ l. Směs byla promíchána a vložena do termobloku na 37 °C/ 30 min. Následně k zastavení reakce enzymu DNázy byly přidány 2 μ l 50mM EDTY (8 pH) a směs byla znovu promíchána a zahřáta na 65 °C/ 10 min. Na NanoDropu jsme změřili výslednou koncentraci pročištěného vzorku RNA bez DNA.

Do mikrozkušavky s celkovým množstvím 500 ng RNA bylo přidáno postupně 2 μ l pufru reverzní transkriptázy, 0,5 μ l enzymu reverzní transkriptázy a příslušné množství dH₂O k doplnění na celkový objem 10 μ l. Vzorek byl vložen do termo-cycleru na 22 °C/ 5 minut, 42 °C/ 30 min, 85 °C/ 5 min a následně 4 °C/ ∞ . Vzorky cDNA byly před dalším použitím uloženy do lednice, vzorky RNA do mrazáku o teplotě -80 °C.

Dle počtu jamek byl vytvořen mastermix dle tabulky na 1 jamku 96 jamkové destičky pro každou dvojici primerů.

MM (mastermix)	Na 1 jamku
EvaGreen dye	5 μ l
3% Reverse primer	1 μ l
3% Forward primer	1 μ l
dH ₂ O	1 μ l

Vzorek 10 μ l cDNA byl naředěn 10 μ l zředěné barvy Forget-Me-Not (2,5 μ l 40x Forget-Me-Not + 7,5 μ l dH₂O). Do jedné jamky s 8 μ l MM směsi byly přidány 2 μ l naředěné cDNA. Devadesátijamková destička přikrytá ochrannou fólií byla analyzována v přístroji LightCycler 480 (Roche). Po jednom cyklu preinkubace následovalo 45 cyklů amplifikaci s cílovou teplotou 95 °C/ 2 min (tzv. ramp rate 4,4 °C/s) a 1 cyklus tání. Výsledky byly zpracovány v programu LightCycler 480 RT-PCR. Relativní genová exprese byla vypočítána na základě $\Delta\Delta C_q$ metody za použití β -aktinu, jako referenčního genu (výsledek vztažen k expresi β -aktinu v %, kdy 100 % odpovídá stejné expresi).

Rat insulin High Sensitivity ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) na měření množství inzulinu a proinzulinu

Příprava vzorku k analýze: přibližně od 0,8 milionu transfekovaných buněk v šestijamkové destičce bylo odsáto médium a vyměněno za 1 ml KRH obohaceného o 0,1% BSA, 2,5mM glukózu a 2mM L-glutamin. Buňky byly ponechány 1 hodinu v inkubátoru s CO₂ atmosférou. Následně bylo k polovině

přidáno 14 µl 1M roztoku glukózy, aby výsledná koncentrace glukózy byla přibližně 16,5 mM. Po hodině bylo od všech vzorků odebráno 200 µl média (obohaceného KRH) a buňky seškrábány a přeneseny do mikrozkuumavek. Vzorek obohaceného KRH na analýzu výlevu inzulinu byl ihned přenesen na led a do mrazáku o - 80 °C. Buňky byly stočeny v chlazené centrifuze při 400 RCF na 5 minut ve 4 °C. Supernatant byl velmi opatrně odsát a pelet resuspendován v přibližně 60-80 µl roztoku RIPA a 10% PMSF. Vzorek byl ponechán na ledu 30 minut a následně stočen na 5000 G po 20 minut ve 4 °C. Supernatant byl odebrán do čerstvé mikrozkuumavky a uschován do - 80 °C v mrazicím boxu. Z 15 µl vzorku byla stanovena celková koncentrace proteinů pomocí BCA metody pro kalibraci dalšího měření.

ELISA Biovendor: Nejprve byla provedena zkušební analýza k optimalizaci ředění vzorku. Na základě jejích výsledků byly naředěny vzorky lyzátu buněk v RIPA pufru či roztoku 0 eseje 1:10 000 a vzorky média 1:30 až 1:40. Dále bylo provedeno měření dle návodu od firmy Biovendor při 420 nm a 630 nm.

Mercodia Rat/Mouse Proinsulin ELISA: Buněčné lyzáty byly podle výsledků zkušební analýzy naředěny 10 000x v RIPA pufru či v roztoku 0 eseje od výrobce. Následoval postup dle pokynů od výrobce Mercodia. Absorbance vzorků byla změřena při 420 nm a 630 nm. K vyhodnocení koncentrace inzulinu sloužila dle kalibrační řada a rovnice lineární křivky.

Stanovení množství proteinů v INS1E buňkách BCA metodou

Pomocí metody BCA (bicinchoninové kyseliny) jsme zjišťovali koncentraci celkového proteinu ve vzorku. Reakce využívá reakci BCA s mědí v soli CuSO_4 za vzniku barevné sraženiny. Na základě absorbance při 562 nm se díky řadě standardů o známé koncentraci BSA (bovinního sérového albuminu) podařilo ze závislosti absorbance na koncentraci odečíst celkovou koncentraci proteinu.

SDS elektroforéza a Western blot

Buňky byly přeneseny do mikrozkuumavky a umístěny na led. Vzorky byly stočeny ve vychlazené centrifuze (4 °C) na 300 G/ 5 minut. Supernatant byl odsát a peleta resuspendována v 70-150 µl lyzačního pufru RIPA s 10% PMSF. Po 30minutové inkubaci na ledu byly vzorky stočeny ve vychlazené centrifuze (4 °C) na 10 000 G/ 20 minut. Supernatant byl odsát do čisté mikrozkuumavky a pomocí BCA metody byla stanovena koncentrace proteinů. Na základě zjištěné koncentrace bylo množství odpovídající 20 µg proteinu přeneseno do čisté mikrozkuumavky společně s 5x koncentrovaným SB (sample buffer, 10% merkapt ethanol (ME)) a vodou do celkového objemu 30 µl/jamku. Zbýlé množství supernatantu bylo uloženo do -80 °C. Vzorek se SB, ME a vodou byl v povařen 5-10 minut a stočen na mikrocentrifuze.

Na základě molekulové hmotností Nox4 (63 kDa) Byl připraven 10% dělicí spodní a 4% zaostřovací horní gel dle tabulky ve dvou provedeních. Typ 1 gel byl použit do skel s průměrem 1,00 mm, typ 2 gel

do skel s průměrem 1,5 mm. Chemikálie byly přidávány postupně dle pořadí v tabulce a po promíchání co nejrychleji nality do připravené aparatury. Po zatuhnutí 10% gelu (zhruba 30 minut) byl přidán 4% gel a hřebínek pro vytvoření jamek na vzorky (tuhnutí zhruba 15 minut).

10% dělicí spodní gel		
chemikálie	Typ 1 (2 gely, 1,00 mm)	TYP 2 (2 gely, 1,5 mm)
Voda (dH ₂ O)	4,15 ml	4,18 ml
TRIS 8,8 pH	2,49 ml	6 ml
Akrylamid (30%)	3,32 ml	5,33 ml
TEMED	7 µl	6 µl
Persíran amonný (10%)	70 µl	160 µl

4% zaostřovací vrchní gel		
chemikálie	Typ 1 (2 gely, 1,00 mm sklo)	TYP 2 (2 gely, 1,5 mm sklo)
Voda (dH ₂ O)	3,05 ml	2,025 ml
TRIS 6,8 pH	1,25 ml	3,00 ml
Akrylamid (30%)	0,65 ml	0,75 ml
TEMED	5 µl	15 µl
Persíran amonný (10%)	50 µl	90 µl

Dělení proteinů jednotlivých vzorků dávkovaných po 20 ug bylo provedeno v soupravě Mini-protean III od firmy BioRad. Nejprve 35 minut na 70 V a následně 1 hodinu při napětí 150 V. Proteiny byly přeneseny na PVDF membránu a úspěšnost transportu ověřena ihned roztokem Ponceau S (či po skončení pokusu permanentní barvou Coomassie Blue). Následně byly membrány blokovány 1 hodinu v roztoku 5% mléka a TTBS. Po pečlivém oplachu byly vystaveny primární a sekundární protilátce ředěné v TTBS, dle rozpisu v tabulce v oddělení chemikálie a roztoky. Detekce proteinu byla provedena na základě chemiluminiscenční reakce po inkubaci s křenovou peroxidázou za použití substrátu křenové peroxidázy West Femto a přístroje ChemiDoc.

Overexpresse NOX4 po stimulaci glukózou

Buňky INS1E byly 1. den nasety na 4 malé kultivační lahve v počtu $1,5 \times 10^6$ buněk/lahev. Třetí den byl normalizován objem média na 2 ml a ke 3 vzorkům (mimo kontroly) byl přidán roztok 1M glukózy tak, aby výsledná koncentrace glukózy byla 25 mM. Kontrola bez glukózy byla zpracována ihned, další vzorky v intervalech 30 minut, 1 hodiny a 2 hodin od přidání glukózy. Z buněk byla vyizolována RNA

pomocí RNeasy Protect Mini Kitu od firmy Qiagen. Následně jsme provedli přepis do cDNA a metodou RealTime PCR ověřili transkripci genu NOX4.

Analýza výsledků a statistika

Výsledky byly graficky a statisticky zpracovány v programu GraphPad Prism 5. K výpočtu statisticky významných rozdílů byla použita metoda t-test (nepárový t-test a f-test rozptylu) a 1way ANOVA s Tukeyovou metodou porovnání všech sloupců (signifikantní úroveň alfa 0,05 (95% *confidence intervals*)), odchylky SEM (*standard error mean*). K další práci s daty byl využit Microsoft Excel a ImageJ (Fiji, Java).

6. Cíle práce

Na základě vysokého výskytu v ledvinách se NOX4 nazývá také renální NADPH oxidáza. V kůře ledvin po indukci glukózou (25 mM) dochází ke zvýšení exprese jejího genu a navýšení množství proteinu (p22 a p47). Na ostatní NOX glukóza nepůsobí. NOX4 se účastní narušení redoxního prostředí u diabetické nefropatie (Sedeek et al., 2010).

- Cílem bylo sledovat vliv zvýšené koncentrace glukózy (25mM médium) na expresi genu *Nox4* u β buněk INS-1E a ověření hypotézy, podle které má glukóza indukční vliv na expresi.

Základní transkripční faktory exprese inzulinu MAFA a PDX1 jsou citlivé k redoxním změnám a přítomnosti indukční glukózy.

- Naším cílem bylo zjistit vliv snížené hladiny NOX4 u INS-1E buněk na genovou expresi základních transkripčních faktorů *Pdx1* a *MafA*, abychom zjistili, zda jsou regulovány změnou v redoxním prostředí vlivem NOX4.

Pro enzymy sestříhu proinzulinu na inzulin je důležité okyselení váčků a přítomnost iontů Ca^{2+} a Zn^{2+} . Nejprve dochází k odštěpení C peptidu endopeptidázami PC1/3 a PC2, následně je odstraněna C-terminální sekvence CPE.

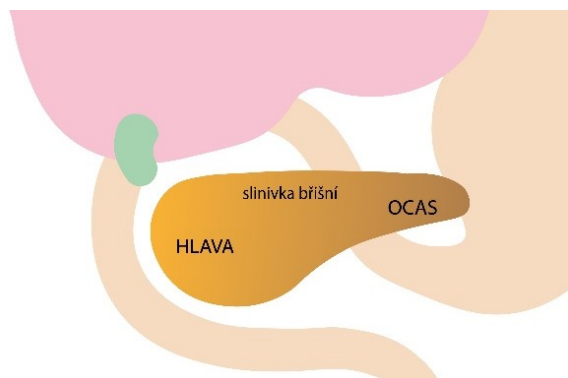
- Uložili jsme si za cíl sledovat změny v expresi základních enzymů sestříhu inzulinu PC1, PC2 a CPE při snížené hladině NOX4 v INS-1E buňce, abychom ověřili vliv změny redoxního prostředí vlivem NOX4 na jejich expresi a vliv NOX4 na maturaci inzulinu za bazální a indukční koncentrace glukózy.

V předchozích pokusech naší laboratoře bylo zjištěno, že β specifická delece NOX4 u C57BL/6J myši vede k narušení dvofázového výlevu inzulinu při GSIS (Plecita et al., Diabetes, 2020).

- Za cíl jsme si uložili sledovat schopnost potkaních β buněk INS-1E vytvářet proinzulin po snížení hladiny NOX4 pomocí siRNA a naopak po overexpressi NOX4 transfekcí expresním plazmidem. K oběma jsme vytvořili vhodnou negativní kontrolu. Tvorbu proinzulinu v buňce jsme sledovali za bazální hladiny glukózy (simulace hladovění, 2,5 mM/ 1 hodinu) a u buněk vystavených krátkodobému zvýšení glykémie na 16,5 mM/ 1 hodinu.
- Za stejných podmínek jsme sledovali jejich výlev inzulinu do média a obsah inzulinu v buněčném lyzátu.

V jednotlivých anatomických částech slinivky člověka se množství LO liší. V koncové ocasní části je jejich počet cca 2x vyšší než v částech hlava a tělo (Wang et al., 2013). Navíc se v této části objevuje větší procento velkých ostrůvků (>50 μm Ø). Množství a velikost ostrůvků však neměla vliv na schopnost jednotlivých částí sekretovat inzulin *in vitro*. U diabetických pacientů dochází k úbytku LO preferenčně v části hlavy (Wang et al., 2013).

- Za cíl jsme si uložili ověřit hypotézu rozdílného počtu LO v částech orgánu hlava a ocas ve slinivce laboratorních myši C57BL/6J na histologických řezech.



Obrázek č. 8: Schéma slinivky břišní

Velikost LO u člověka ovlivňuje jeho poměr endokrinních buněk. Malé ostrůvky jsou architektonicky blízké hlodavcům (Wang et al., 2013). U diabetických pacientů dochází k úbytku LO zejména v části hlavy slinivky. U lidských diabetických LO je podle matematického modelu více kontaktů mezi α buňkami a méně mezi β buňkami, než u zdravé kontroly (Wang et al., 2013).

Zvýšení počtu velikých ostrůvků ($> 10\,000\ \mu\text{m}^2$) bylo sledováno u obézních (ob/ob, leptin-deficientních) a těhotných myší. U myšího modelu s mutací v leptinovém receptoru (db/db), který trpí dyslipidémií, obezitou a diabetem, naopak došlo k poklesu (Kim et al., 2010).

- Naším cílem bylo sledovat změny v počtu a velikosti LO u skupin pokusných myší NOX4 KO a WT v závislosti na jejich věku a stravě (ND vs. diabetický fenotyp na HFD).

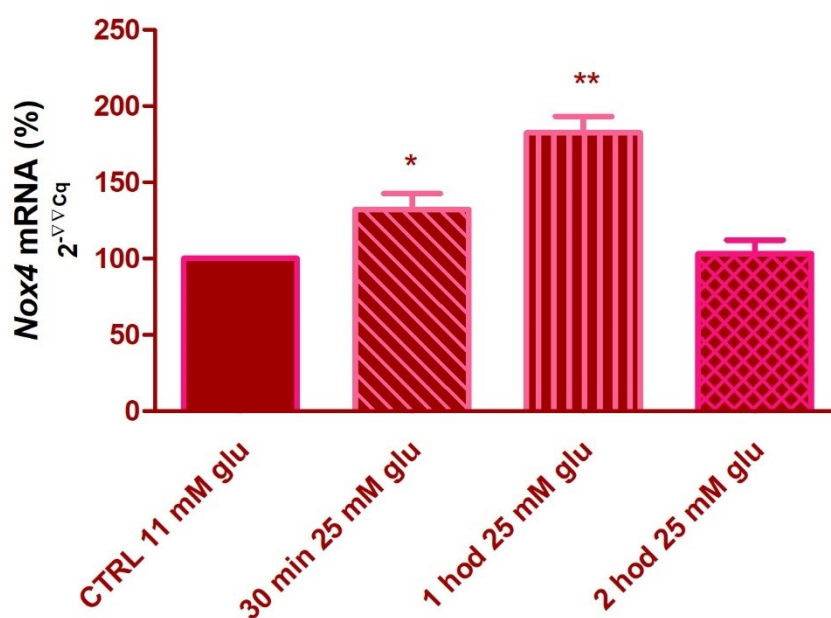
Dediferencované β buňky u diabetických pacientů prochází tzv. přeprogramováním a mimo inzulin vytváří a sekretují také hormon glukagon (White et al., 2013).

- Naším cílem bylo zjistit, zda-li má redoxní prostředí vliv na variabilitu INS-1E β buněk a jejich subpopulací. Snažili jsme se zaznamenat přítomnost subpopulace β buněk pozitivních na glukagon v buněčné kultuře INS-1E a odlišnosti uvnitř kontrolní populace a populace buněk se sníženou hladinou NOX4.

7. Výsledky

Vliv glukózy na expresi genu *Nox4* v INS-1E β buňkách

Pozitivní efekt akutního nárůstu koncentrace glukózy na zvýšení exprese *Nox4* byl pozorován v buňkách ledvin (Sedeek et al., 2010). Abychom zjistili, zda se podobná regulace objevuje také v β buňkách, kontrolní INS-1E buňky jsme inkubovali v normoglykemickém (11 mM glukóza/ 1 hodina) a hyperglykemickém (25 mM/ 0,5-2 hodiny) prostředí a sledovali následné změny v hladinách *Nox4* mRNA v závislosti na koncentraci glukózy a času inkubace, viz. graf č. 1. Koncentraci mRNA u kontrolních buněk v normoglykémii jsme považovali za výchozí hodnotu exprese. Hyperglykémie stimulovala po 30 minutách 32,2% nárůst ($\pm 10,52$ %, $P = 0,0378$) a po jedné hodině 82,6% nárůst ($\pm 10,64$ %, $P = 0,0015$) v hladinách mRNA pro NOX4. Po dvou hodinách v hyperglykémii se exprese vrátila do původních hodnot (vůči kontrole v normoglykémii vyšší o 3 % ± 9 %).



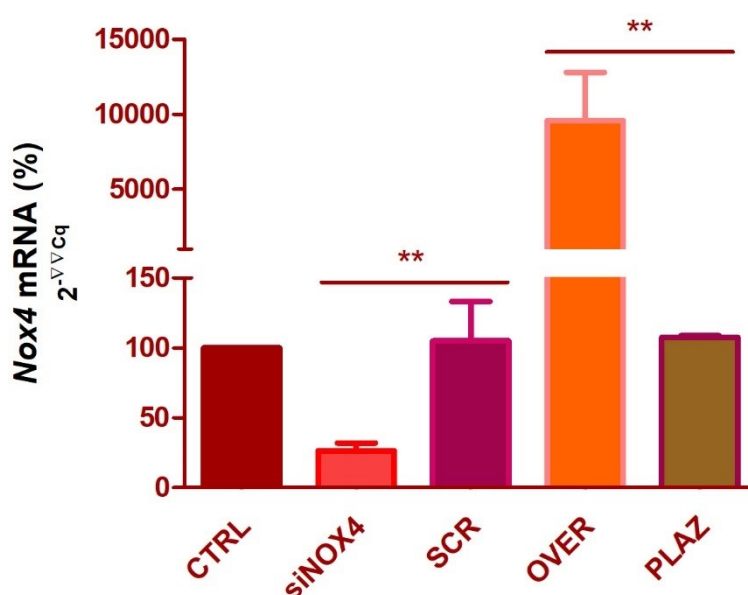
Graf č. 1: Vliv akutního zvýšení glykémie na expresi genu *Nox4* v INS-1E β buňkách

CTRL 11 mM glu – kontrolní buňky inkubované 1 hodinu v 11 mM glukóze, 30 min 25 mM glu – buňky inkubované v 11 mM glukóze, které byly na 30 minut vystaveny 25 mM glukóze, 1 hod 25 mM glu – buňky inkubované v 11 mM glukóze, které byly na 1 hodinu vystaveny účinkům 25 mM glukózy, 2 hod 25 mM glu – buňky inkubované v 11 mM glukóze, které byly na 2 hodiny vystaveny 25 mM glukóze. Výsledky jsou průměrem \pm SEM. Počet N vzorků v kategoriích = 3. Hladina *Nox4* mRNA kontroly CTRL vs. buněk 30 minut v 25 mM glukóze, *, $P < 0,05$, hladina *Nox4* mRNA kontroly CTRL vs. buněk inkubovaných 1 hodinu v 25 mM glukóze, **, $P < 0,01$. Genová exprese byla vztažena k mRNA referenčního genu β aktinu.

Ověření úspěšnosti silencingu a overexprese *Nox4* v INS-1E β buňkách

A) na úrovni mRNA pomocí RT-PCR

U potkaních INS-1E β buněk jsme pomocí dvojice siRNA snížili hladinu mRNA pro NOX4, abychom mohli studovat vliv snížení hladiny proteinu NOX4 na jejich fenotyp. Obdobně jsme se pokusili stimulovat nárůst exprese NOX4 v buňkách pomocí expresního plazmidu pcDNA3.1-mNox4. Vytvořili jsme kontrolní skupinu silencingu s nevazebnou siRNA scramble a kontrolu overexprese s prázdným plazmidem. K ověření úspěšnosti těchto manipulací s hladinami mRNA pro NOX4 jsme zhotovili analýzu mRNA z lyzátu transfekovaných INS-1E buněk pomocí polymerázové řetězové reakce spojené s reverzní transkripcí (RT-PCR), viz. graf č. 1. Hladiny mRNA pro NOX4 byly ve srovnání s kontrolními buňkami (CTRL) u silencovaných buněk výrazně sníženy (pokles o $71,24 \pm 4,951 \%$). Negativní kontrola scramble nevykazovala zásadní změny (pokles o $7,26 \pm 19,48 \%$ proti kontrole). Úspěšnost silencingu byla vůči negativní kontrole statisticky významná ($P = 0,0032$). U overexprimovaných buněk jsme pozorovali významný nárůst oproti CTRL (o $9492 \pm 3220 \%$). Negativní kontrola prázdného plazmidu se nelišila od kontroly (o $7,5 \pm 1,186 \%$ vyšší proti CTRL). Hladiny mRNA u overexprese byly statisticky výrazně vyšší než u negativní kontroly ($P = 0,0041$).

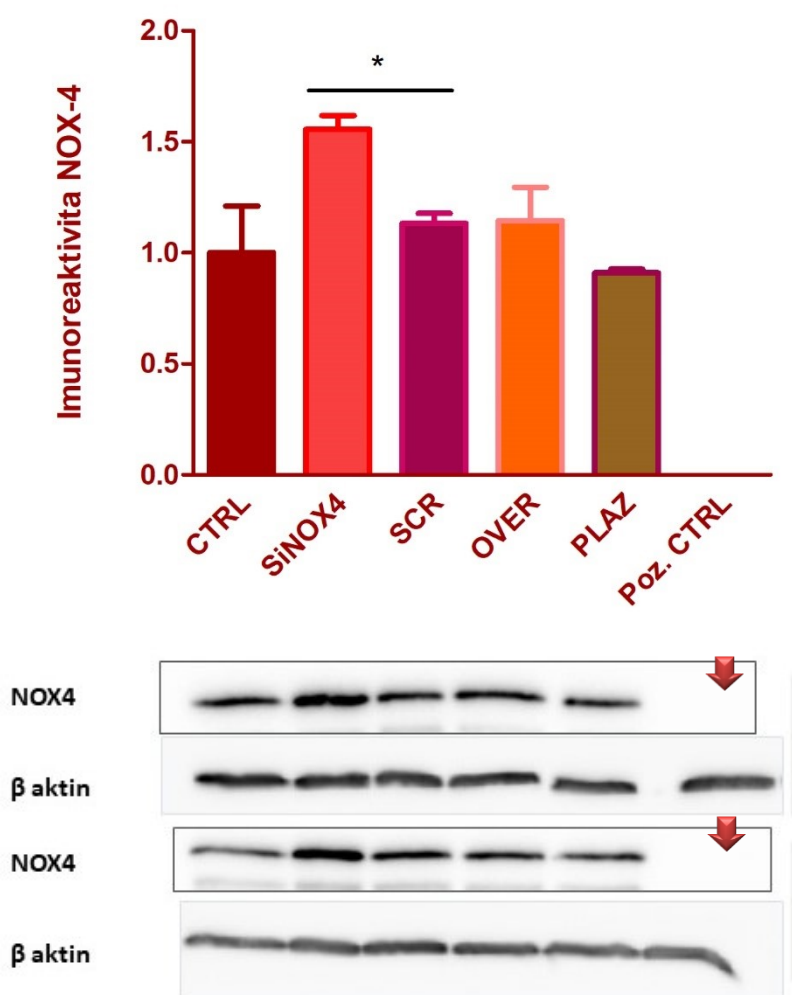


Graf č. 2: Hladiny *Nox4* mRNA pro ověření úspěšnosti silencingu a overexprese

CTRL – kontrola, siNOX4 – *Nox4* silencované buňky, SCR – scramble, negativní kontrola silencingu, OVER – *Nox4* overexprimované buňky, PLAZ – negativní kontrola overexprese. Výsledky jsou průměrem \pm SEM. N (CTRL) = 5, N (siNOX4) = 5, N (SCR) = 4, N (OVER) = 4, N (PLAZ) = 4. Statisticky významný rozdíl siNOX4 vs. SCR a OVER vs. PLAZ, **, $P < 0,01$. Hodnoty mRNA pro NOX4 jsou vztaženy na koncentraci mRNA kontrolního genu β aktinu.

B) Na úrovni proteinu pomocí SDS-elektroforézy a Western blotu

Pro ověření úspěšnosti silencingu a overexprese jsme mimo hladiny mRNA provedli také semikvantifikační imunochemickou analýzu obsahu proteinu NOX4 v INS-1E pomocí SDS-elektroforézy a Western blotu, viz. graf č. 3. Ta u silencovaných buněk překvapivě poukázala na zvýšenou hladinu proteinu NOX4 (zvýšenou o $55,7 \pm 6,143$ % oproti kontrole). U její negativní kontroly scramble byla imunoreaktivita (o $13,2 \pm 4,525$ %) vyšší než u CTRL, stejně jako u skupiny overexprese (o $14,4 \pm 15,05$ % vyšší než kontrola). U negativní kontroly prázdného plazmidu byla (o $9,06 \pm 1,724$ %) nižší než u CTRL. U pozitivní kontroly primární protilátky (Poz. CT) jsme však při použití protilátky proti NOX4 (Abcam, ab133303, viz. kapitola 3) nedetekovaly žádný signál. Jako pozitivní kontrola nám sloužil lyzát ledvin *Rattus norvegicus*, což je tkáň s nejvyšší expresí *Nox4* (NCBI, 2020) doporučena výrobcem protilátky.



Graf č. 3: Obsah proteinu NOX4 v INS-1E buňkách pro ověření úspěšnosti silencingu a overexprese ukázané na dvou nezávislých experimentech

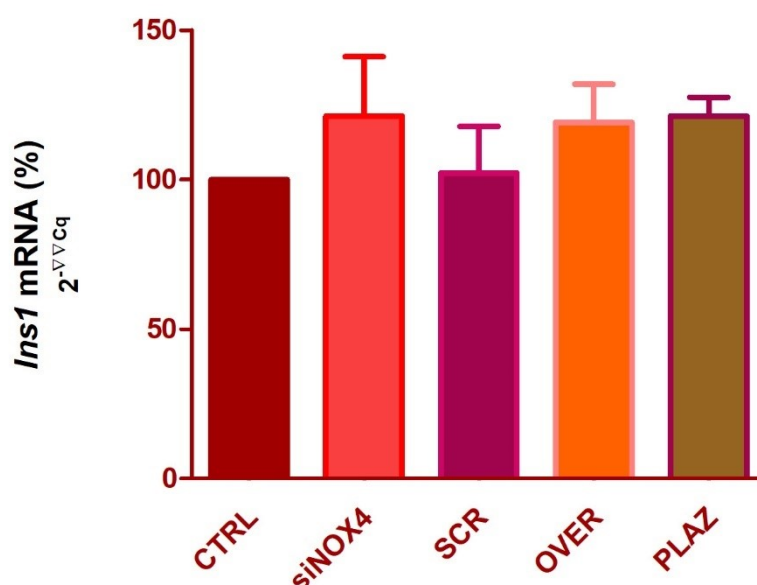
CTRL – kontrola, siNOX4 – *Nox4* silencované buňky, SCR – scramble, negativní kontrola silencingu, OVER – *Nox4* overexprimované buňky, PLAZ – negativní kontrola overexprese. Výsledky jsou průměrem \pm SEM. N vzorků v

každé kategorii = 2. Přesnost nanášky jsme úspěšně ověřili pomocí protilátek proti β aktinu a stanovením celkového proteinu Ponceu S.

Expresní analýza inzulinu, jakožto hlavní molekuly funkce β buňky

Ins1 mRNA

Ins1 je jeden ze dvou genů kódující inzulin u hlodavců. Abychom ověřili přímý vliv NOX4 na jeho expresi, analyzovali jsme mRNA *Ins1* pomocí RT-PCR. Hladiny mRNA *Ins1* byly srovnatelné u všech vzorků. U silencovaných buněk jsme pozorovali drobný nárůst (o $21,3 \pm 19,80$ % vůči kontrole). Jeho negativní kontrola scramble se pohybovala okolo exprese kontroly (o $2,3 \pm 15,54$ % nárůst). U overexprimovaných buněk, byla exprese mírně zvýšena (o $19,2 \pm 12,80$ % proti kontrole) podobně jako u jejich negativní kontroly plazmidu (o $21,4 \pm 6,142$ % proti kontrole).



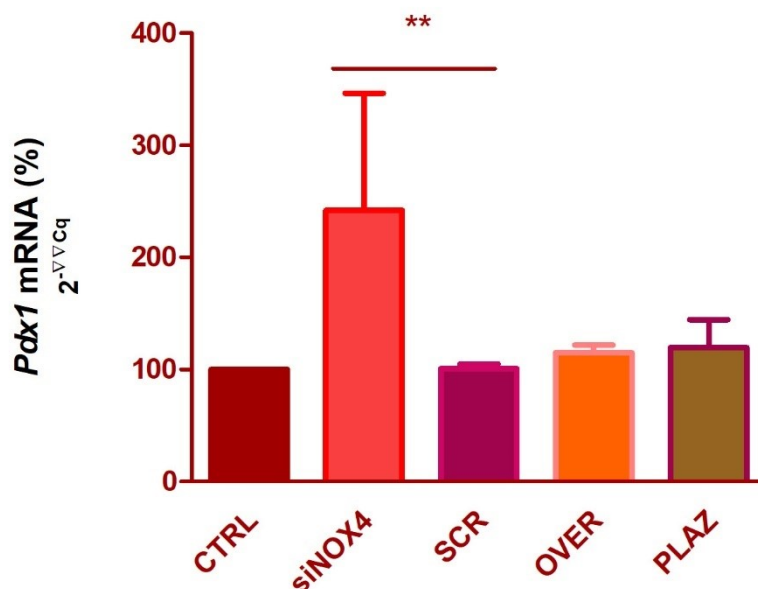
Graf č. 4: Vliv NOX4 na hladinu *Ins1* mRNA v INS-1E β buňkách

CTRL – kontrola, siNOX4 – Nox4 silencované buňky, SCR – scramble, negativní kontrola silencingu, OVER – Nox4 overexprimované β buňky, PLAZ – plazmid, negativní kontrola overexprese. Výsledky jsou průměrem \pm SEM. N (CTRL) = 3, N (siNOX4) = 4, N (SCR) = 4, N (OVER) = 3, N (PLAZ) = 3. Hodnoty jsou vztažené k expresi kontrolního genu β aktinu.

Pdx1 mRNA

PDX1 je jeden z hlavních transkripčních faktorů v β buňkách, kde kontroluje diferenciaci a expresi inzulinových genů (Marshak et al., 2000). Je známa jeho citlivost k redoxním změnám, které mohou navodit snížení jeho exprese a aktivity (Kitamura et al., 2002; Olson et al., 1995). Abychom zjistili, jaký vliv má snížení produkce ROS z NOX4, analyzovali jsme mRNA INS-1E buněk o snížené a zvýšené expresi *Nox4* metodou RT-PCR, viz. graf č. 5. U *Nox4* silencovaných β buněk jsme pozorovali významný nárůst

koncentrace mRNA pro PDX1 (konkrétně o $142 \pm 104,4$ % proti CTRL). Tento rozdíl byl proti jeho negativní kontrole scramble ($0,8 \pm 4,221$ % zvýšená exprese *Pdx1* v porovnání s CTRL) statisticky významný ($P = 0,0033$). U buněk se zvýšenou hladinou *Nox4* mRNA jsme nezaznamenali významnou změnu (došlo k $14,9 \pm 6,853$ % nárůstu oproti CTRL). Podobná hladina byla i u jeho negativní kontroly plazmidu ($19,4 \pm 25,05$ % nárůst proti CTRL).

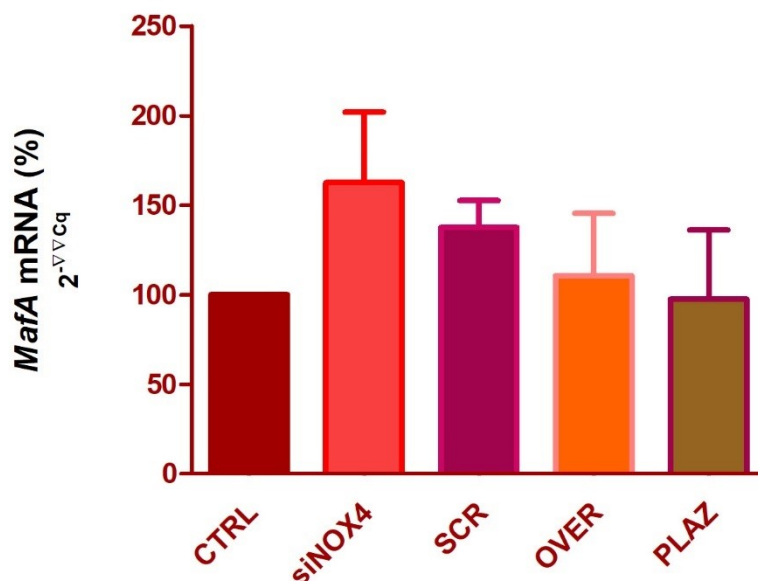


Graf č. 5: Vliv NOX4 na hladinu mRNA pro PDX1 v INS-1E β buňkách

CTRL – kontrola, SiNOX4 – Nox4 silencované buňky, SCR – scramble, negativní kontrola silencingu, OVER – Nox4 overexprimované β buňky, PLAZ – plazmid, negativní kontrola overexprese. Výsledky jsou průměrem \pm SEM. N (CTRL) = 3, N (siNOX4) = 3, N (SCR) = 3, N (OVER) = 4, N (PLAZ) = 3. *Pdx* mRNA u siNOX4 vs. SCR **, $P < 0,01$. Hodnoty jsou vztažené k expresi kontrolního genu β aktinu.

MafA mRNA

Transkripční faktor inzulinového genu MAFA patří mezi redoxně regulované geny. Je znám negativní vliv dlouhodobé hyperglykémie a zvýšené tvorby ROS na snížení jeho genové exprese (Harmon et al., 2005; Xu et al., 2013). Není znám vliv redoxního prostředí ve fyziologicky přirozených podmínkách. Abychom zjistili vliv NOX4 na expresi tohoto genu, který má vliv na správnou funkci β buněk, analyzovali jsme hladiny MafA mRNA metodou RT-PCR u skupin INS-1E buněk s ovlivněnou genovou expresí NOX4, viz. graf č. 6. U *Nox4* silencovaných jsme zaznamenali nárůst v expresi MafA oproti kontrole (zvýšení o $62,6 \pm 39,57$ %). Scramble negativní kontrola silencingu měla taktéž zvýšenou hladinu MafA mRNA oproti kontrole (konkrétně o $37,5 \pm 15,03$ %), obdobně jako overexprimované buňky (nárůst o $10,6 \pm 34,81$ %). Negativní kontrola overexprese plazmidu měla expresi v hladinách blízkých kontrole (o $2,4 \pm 38,58$ % nižší). Nepodařilo se nám prokázat žádné statisticky významné rozdíly v expresi tohoto genu.



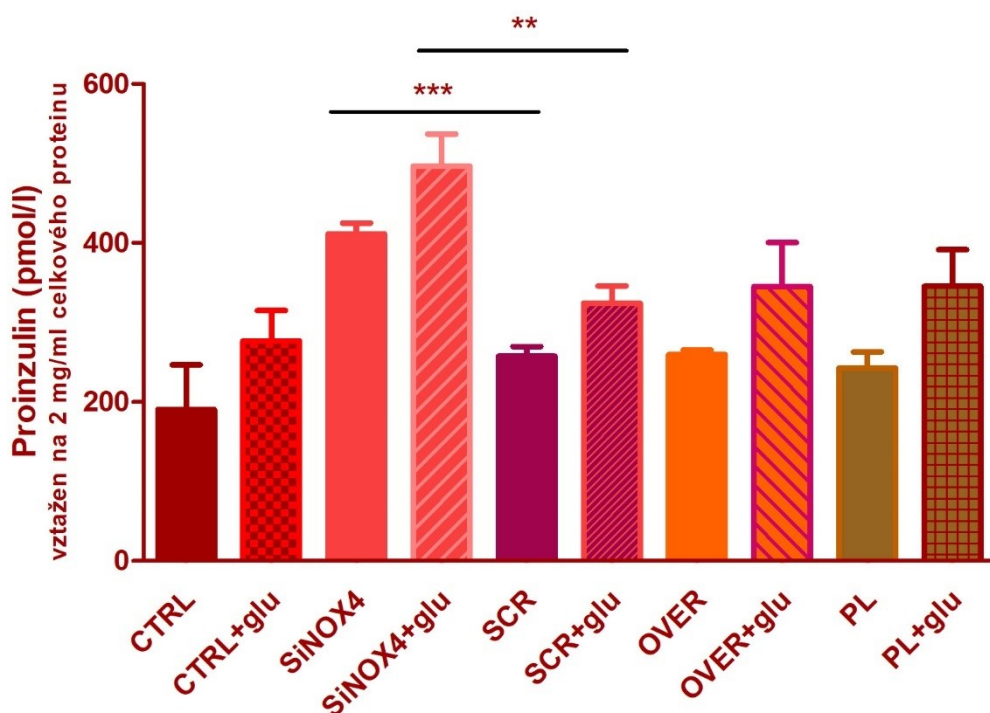
Graf č. 6: Vliv NOX4 na hladinu mRNA pro MAFA v ISN-1E β buňkách

CTRL – kontrola, siNOX4 – Nox4 silencované buňky, SCR – scramble negativní kontrola silencingu, OVER – Nox4 overexprimované buňky, PLAZ – negativní kontrola overexprese, prázdný plazmid. Výsledky jsou průměrem ± SEM, vztažené k expresi kontrolního genu β aktinu. Počet N vzorků v každé kategorii = 3. Rozdíly v hladinách mRNA mezi jednotlivými skupinami nebyly statisticky významné. Hodnoty jsou vztažené k expresi kontrolního genu β aktinu.

Obsah proinzulinu v lyzátu buněk INS-1E

H₂O₂ je důležitým MCFs a signální molekulou, která se účastní GSIS. MUT myši (NOX4^βKO) mají porušený dvoufázový výlev inzulínu a další znaky prediabetického fenotypu (Plecita-Hlavata et al., 2020). Věříme tak, že právě NOX4 je hlavním zdrojem H₂O₂ pro ovlivnění GSIS. Jakým způsobem se této regulace účastní, zatím není známo. Expresi inzulínu do značné míry ovlivňuje koncentrace glukózy. Akutně zvýšená glykémie má vliv pozitivní, a naopak dlouhodobá hyperglykémie vliv negativní. Abychom zjistili, jaký vliv má na koncentraci proinzulinu v buňce NOX4, analyzovali jsme pomocí vysoce citlivé ELISA eseje obsah proinzulinu v lyzátu INS-1E buněk, viz. graf č. 7. Výsledky jsme vztáhli k obsahu naměřeného celkového proteinu 2 mg/ml. Polovina buněk byla vystavena na 1 hodinu bazálními hodnotám glykémie (2,5 mM) tak, abychom ověřili vliv NOX4 na bazální expresi inzulínu a produkci proinzulinu. Druhou část buněk jsme na 1 hodinu inkubovali v 16,5 mM glukóze (+glu) k navození GSIS a ke zvýšené expresi genu inzulínu. Koncentrace proinzulinu u *Nox4* silencovaných buněk byla při nízkých hladinách glykémie významně zvýšena (411,4 ± 13,58 pmol/l, statisticky významný rozdíl vůči negativní kontrole scramble s koncentrací 257,6 ± 12,02 pmol/l, P < 0,0001). Bazální obsah proinzulinu byl u všech ostatních vzorků podobný kontrole (u kontroly 190,6 ± 56,31 pmol/l, u overexprese *Nox4* 259,8 ± 5,41 pmol/l a jeho negativní kontroly plazmidu 242,8 ± 19,96 pmol/l).

Obsah proinzulinu silencovaných buněk vystavených akutně zvýšené glykémii (+glu) se obdobně jako u bazální glykémie pohyboval nad hodnotami ostatních vzorků ($496,6 \pm 40,61$ pmol/l, statisticky významně nad koncentrací své negativní kontroly scramble o hodnotách $324,1 \pm 21,96$ pmol/l, $P = 0,0054$). Koncentrace proinzulinu po zvýšení glykémie u kontrolních buněk vzrostla ($276,9 \pm 38,02$ pmol/l), stejně jako u negativní kontroly silencingu scramble, overexprimovaných buněk ($345,3 \pm 55,47$ pmol/l) a jejich negativní kontroly plazmidu ($345,7 \pm 45,96$ pmol/l).



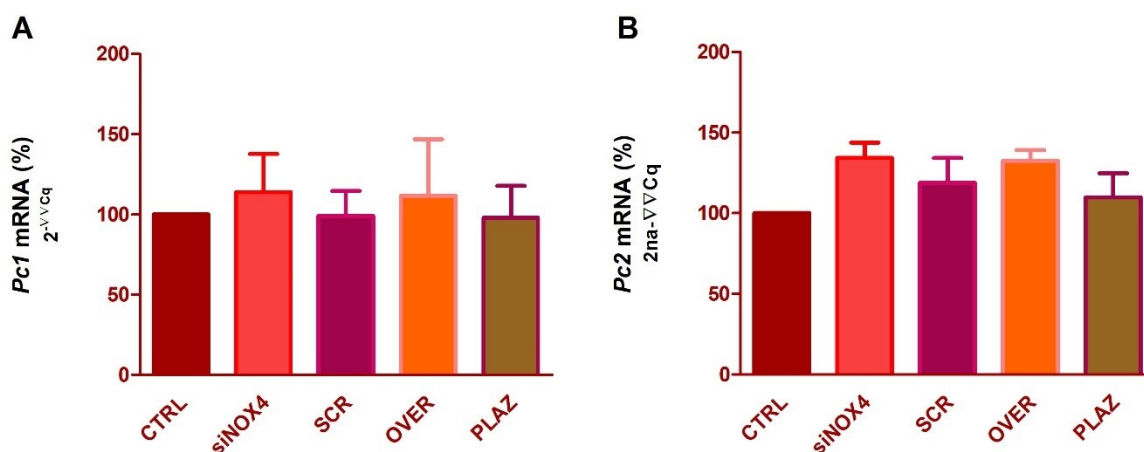
Graf č. 7: Vliv NOX4 na obsah proinzulinu v INS-1E β buňkách při bazální (2,5 mM/ 1 hodina) a akutně zvýšené hladině glykémie (+glu, 16,5 mM/ 1 hodina)

CTRL- kontrolní buňky vystavené bazální glykémii, CTRL+glu – kontrolní buňky v médiu o zvýšené glykémii, siNOX4- silencované buňky vystavené bazální glykémii, siNOX4+glu – silencované buňky v médiu o zvýšené glykémii, SCR- kontrolní buňky silencingu scramble vystavené bazální glykémii, SCR+glu – kontrolní buňky silencingu scramble v médiu o zvýšené glykémii, OVER- overexprimované buňky vystavené bazální hodnotám glykémie, OVER+glu – overexprimované buňky vystavené zvýšené glukémii, PLAZ- kontrolní buňky overexprese plazmid vystavené bazální hodnotám glykémie, PLAZ+glu – kontrolní buňky overexprese v médiu o zvýšené glykémii. Výsledky jsou průměrem \pm SEM. Počet N vzorků, N (CTRL, CTRL+glu) = 3, N (siNOX4, siNOX4+glu) = 4, N (SCR, SCR+glu) = 5, N (OVER, OVER+glu) = 3, N (PLAZ, PLAZ+glu) = 3. siNOX4 vs. SCR ***, $P < 0,0001$, siNOX4+glu vs. SCR+glu, **, $P < 0,01$.

Pc1 a Pc2 mRNA

Proprotein konvertázy 1 a 2 jsou dva zásadní enzymy pro sestřih a maturaci molekuly inzulinu. Abychom zjistili, zda NOX4 ovlivňuje funkci β buněk skrze cílení na sestřih inzulinu z proinzulinu, analyzovali jsme vliv NOX4 na mRNA těchto dvou endopeptidáz, viz. graf č. 8. Hladiny mRNA pro Pc1

(A) byly u silencovaných buněk zvýšené (o $13,9 \pm 23,79$ % proti kontrole). U jeho negativní kontroly scramble zůstala exprese na hladinách podobných kontrole (o $0,9 \pm 15,48$ % nižší proti kontrole). Overexprese nijak významně neovlivnila expresi Pc1 (proti kontrole byla exprese vyšší o $11,7 \pm 35,15$ %) a jeho negativní kontrola plazmid se pohybovala okolo hodnot kontroly (hodnoty o $2 \pm 19,73$ % sníženy proti kontrole). Nezaznamenali jsme žádné statisticky významné rozdíly v expresi Pc1. Hladiny mRNA pro Pc2 (B) byly u všech skupin zvýšeny oproti kontrole bez jakýchkoli významných rozdílů. Konkrétně u silencovaných buněk jsme pozorovali nárůst nejvyšší (o $34,2 \pm 9,55$ % oproti kontrole) a jeho negativní kontrola scramble vykazovala nižší nárůst (o $19,0 \pm 15,20$ % proti kontrole). Hodnoty exprese u overexprimovaných buněk se podobali silencingu ($32,5 \pm 6,605$ % navýšení proti kontrole) a jejich negativní kontrola s prázdným plazmidem měla z pokusných vzorků expresi Pc2 nejbližší kontrole (o $10,0 \pm 14,76$ % zvýšenou proti CTRL).



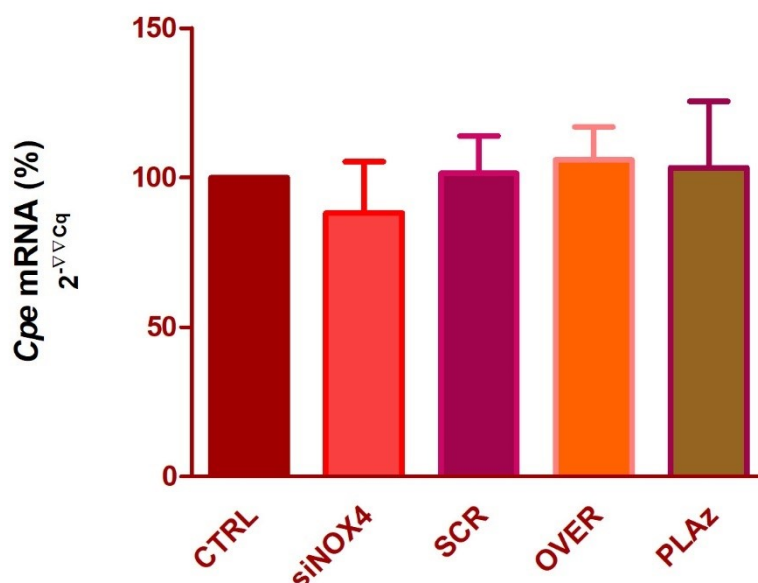
Graf č. 8: Vliv NOX4 na expresi Pc1 (A) a Pc2 (B) v INS-1E β buňkách

CTRL- kontrola, siNOX4 – silencované buňky, SCR – scramble negativní kontrola silencingu, OVER – overexprimované buňky, PLAZ – plazmid, negativní kontrola overexprese. Výsledky jsou průměrem \pm SEM, vztahené k expresi kontrolního genu β aktinu. Počet N vzorků v každé kategorii grafu A = 3. Počet N vzorků u grafu B byl N(CTRL) = 3, N(SiNOX4) = 4, N(SCR) = 4, N(OVER) = 4, N(PLAZ) = 3. Rozdíly v hladinách mRNA mezi jednotlivými skupinami nebyly statisticky významné.

Cpe mRNA

Závěrečným odštěpením sekvenční na C konci proinzulinu karboxypeptidázou E (CPE) vzniká maturovaná molekula inzulinu, která je uskladněna v sekrečním váčku a na základě stimulace vylita do krevního řečiště. Spolu s PC1 a PC2 je CPE nejdůležitějším enzymem maturace inzulinu. Jejich hladina v β buňce přímo ovlivňuje schopnost výlevu inzulinu. Abychom zjistili, zda NOX4 ovlivňuje stádium maturace inzulinu, analyzovali jsme vliv NOX4 na expresi genu *Cpe* v potkaních INS-1E β buňkách, viz. graf č. 9. V hladinách mRNA pro CPE u silencovaných buněk bylo pozorováno mírné snížení proti kontrole (o $11,81 \pm 17,15$ %). Negativní kontrola silencingu scramble se pohybovala okolo kontrolních

hodnot ($0,4 \pm 12,49$ % vyšší hladinu mRNA). Zanedbatelné zvýšení se objevilo u overexprimovaných buněk ($0,6 \pm 10,90$ %) a u jejich negativní kontroly s prázdným plazmidem ($0,3,3 \pm 22,18$ % nárůst).

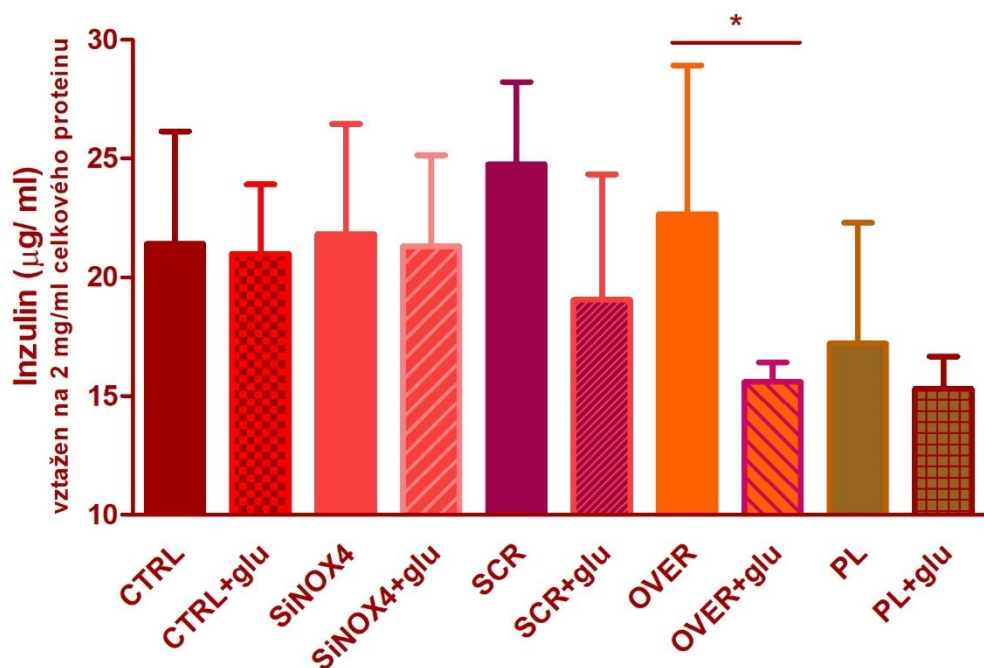


Graf č. 9: Vliv NOX4 na expresi genu Cpe v INS-1E β buňkách

CTRL- kontrola, siNOX4 – silencované buňky, SCR – scramble negativní kontrola silencingu, OVER – overexprimované buňky, PLAZ – plazmid, negativní kontrola overexprese. Výsledky jsou průměrem \pm SEM, vztahené k expresi kontrolního genu β aktinu. Počet N vzorků byl: N(CTRL) = 3, N(SiNOX4) = 4, N(SCR) = 4, N(OVER) = 4, N(PLAZ) = 3. Rozdíly v hladinách mRNA mezi jednotlivými skupinami nebyly statisticky významné.

Obsah inzulinu v lyzátu INS-1E buněk

Naším cílem bylo zjistit, zda změny v hladinách NOX4 ovlivňují bazální tvorbu inzulinu (v prostředí s 2,5 mM glukózou/ 1 hodinu) a hladinu inzulinu po akutní glukózové stimulaci (+glu, 16,5 mM glukóza/ 1 hodinu). Obdobně jako v předešlém případě jsme INS-1E buňky rozdělili do dvou skupin o rozdílné koncentraci glukózy v médiu a analyzovali obsah proteinu vysoce citlivou ELISA esejí, viz. graf č. 10. Výsledky jsme vztáhli k obsahu celkového proteinu 2 mg/ml. Bazální koncentrace inzulinu byly srovnatelné u všech vzorků ($21,40 \pm 4,742$ μ g/ml u kontroly, $21,82 \pm 4,631$ μ g/ml u silencovaných buněk, $24,75 \pm 3,466$ μ g/ml u scramble negativní kontroly, $22,66 \pm 6,246$ μ g/ml u overexprimovaných buněk a $17,21 \pm 5,090$ μ g/ml u plazmidu). U buněk vystavených akutnímu nárůstu glykémie (+glu) se koncentrace inzulinu v lyzátu také pohybovala v rámci podobných hodnot u kontroly ($20,99 \pm 4,631$ μ g/ml), silencovaných buněk ($21,30 \pm 3,831$ μ g/ml) a jejich negativní kontroly scramble ($19,04 \pm 5,293$ μ g/ml). U overexprimovaných buněk ($15,59 \pm 0,827$ μ g/ml) a jejich kontroly prázdného plazmidu ($15,31 \pm 1,357$ μ g/ml) byly hodnoty nižší. Na rozdíl od ostatních skupin, při porovnání obsahu inzulinu v lyzátu u overexprimovaných buněk v bazálních a zvýšených koncentracích glukózy byl statisticky důležitý rozdíl ($P = 0,0125$).



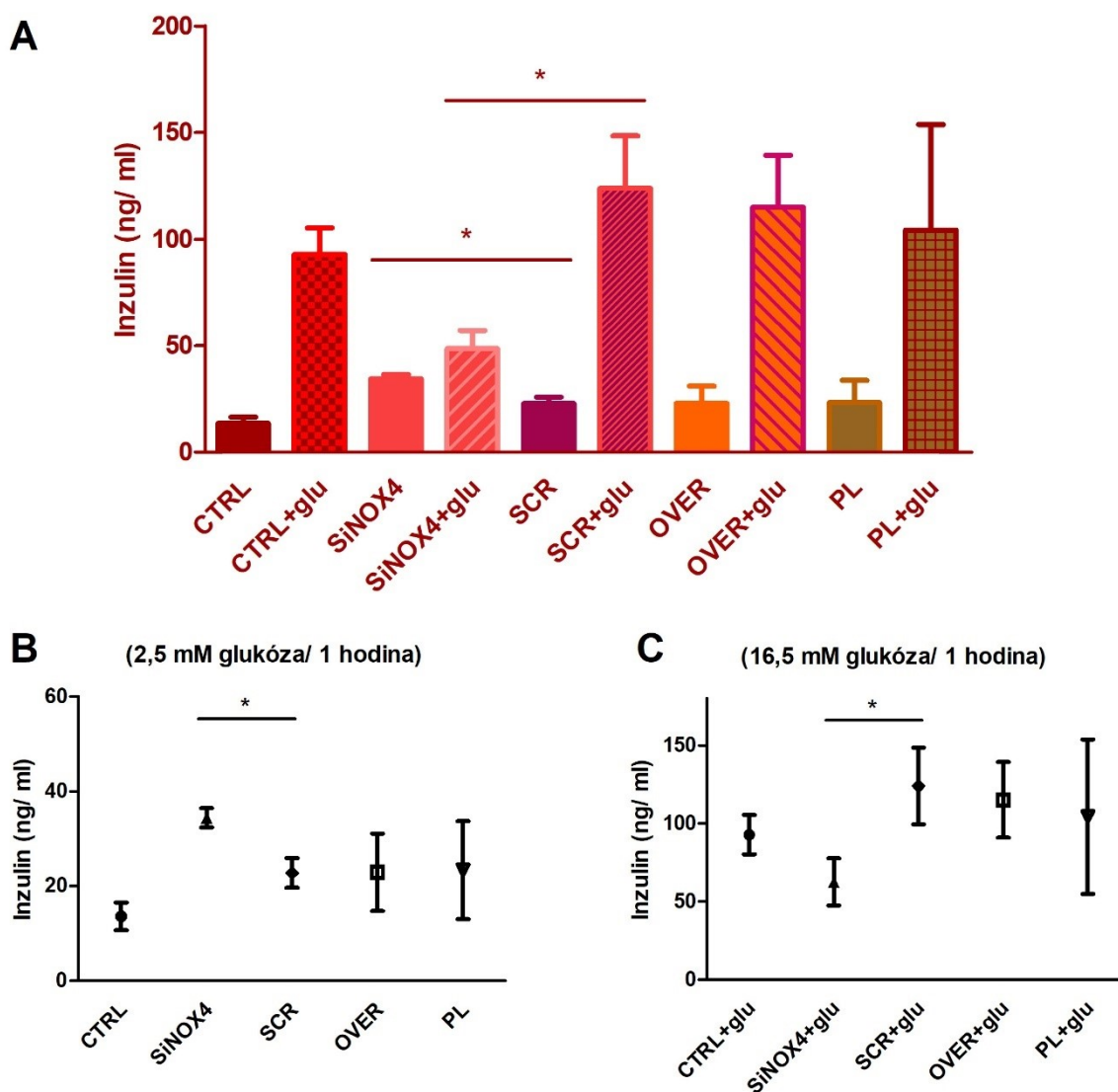
Graf č. 10: Vliv NOX4 na obsah inzulinu v INS-1E β buňkách při bazální (2,5 mM/ 1 hodina) a akutně zvýšené hladině glykémie (+glu, 16,5 mM/ 1 hodina)

CTRL- kontrolní buňky vystavené bazální glykémii, CTRL+glu – kontrolní buňky v médiu o zvýšené glykémii, siNOX4- silencované buňky vystavené bazální glykémii, siNOX4+glu – silencované buňky v médiu o zvýšené glykémii, SCR- kontrolní buňky silencingu scramble vystavené bazální glykémii, SCR+glu – kontrolní buňky silencingu scramble v médiu o zvýšené glykémii, OVER- overexprimované buňky vystavené bazálními hodnotám glykémie, OVER+glu – overexprimované buňky vystavené zvýšené glykémii, PLAZ- kontrolní buňky overexprese plazmid vystavené bazálními hodnotám glykémie, PLAZ+glu – kontrolní buňky overexprese v médiu o zvýšené glykémii. Výsledky jsou průměrem \pm SEM. Počet N vzorků v kategoriích = 3. Statisticky významný rozdíl OVER vs. OVER+glu *, $P < 0,05$.

Sekrece inzulinu u INS-1E buněk

Jak je vidět na fenotypu mutantní myši bez *Nox4* genu v β buňkách, snížení hladiny NOX4 má vliv na správný průběh GSIS (Plecita-Hlavata et al., 2020). Abychom ověřili vliv NOX4 na citlivost β buněk ke glukóze, sledovali jsme schopnost výlevu inzulinu u INS-1E potkaních β buněk s ovlivněnou hladinou NOX4, viz. graf č. 11 (A). Pomocí citlivé ELISA metody jsme měřili koncentraci inzulinu uvolněného do média při bazální (B – konkrétní srovnání) a glukózou stimulované (+glu) (C – konkrétní srovnání) sekreci inzulinu. Jak je vidět na grafu A a B, bazální výlev inzulinu u silencovaných buněk ($34,43 \pm 2,025$ ng/ml) byl významně vyšší, než u kontroly ($13,61 \pm 2,916$ ng/ml) a jeho negativní kontrole scramble ($22,80 \pm 3,114$ ng/ml) ($P = 0,0351$). Bazální výlev inzulinu u overexprimovaných buněk ($22,90 \pm 8,166$ ng/ml) byl podobný výlevu u jeho negativní kontroly prázdného plazmidu ($23,37 \pm 10,37$ ng/ml). Akutní zvýšení glykémie vyvolalo u kontrolních buněk dle očekávání strmý nárůst výlevu inzulinu (na $92,85 \pm 12,50$ ng/ml), podobně jako u negativní kontroly scramble ($123,9 \pm 24,48$ ng/ml), overexprese ($115,0$

$\pm 24,20$ ng/ml) a prázdného plazmidu ($104,3 \pm 49,47$ ng/ml). Nejnižší schopnost výlevu inzulinu na popud akutního zvýšení glykémie měli silencované buňky, u nichž se GSIS pohybovala okolo hodnot bazální sekrece ($48,67 \pm 8,461$ ng/ml), což byla koncentrace statisticky podprůměrná (v porovnání s jeho negativní kontrolou scramble, $P = 0,0384$).



Graf č. 11: Vliv NOX4 na schopnost INS-1E β buněk sekretovat inzulin (A) při bazální (2,5 mM/ 1 hodina) (B) a akutně zvýšené hladině glykémie (+glu, 16,5 mM/ 1 hodina) (C)

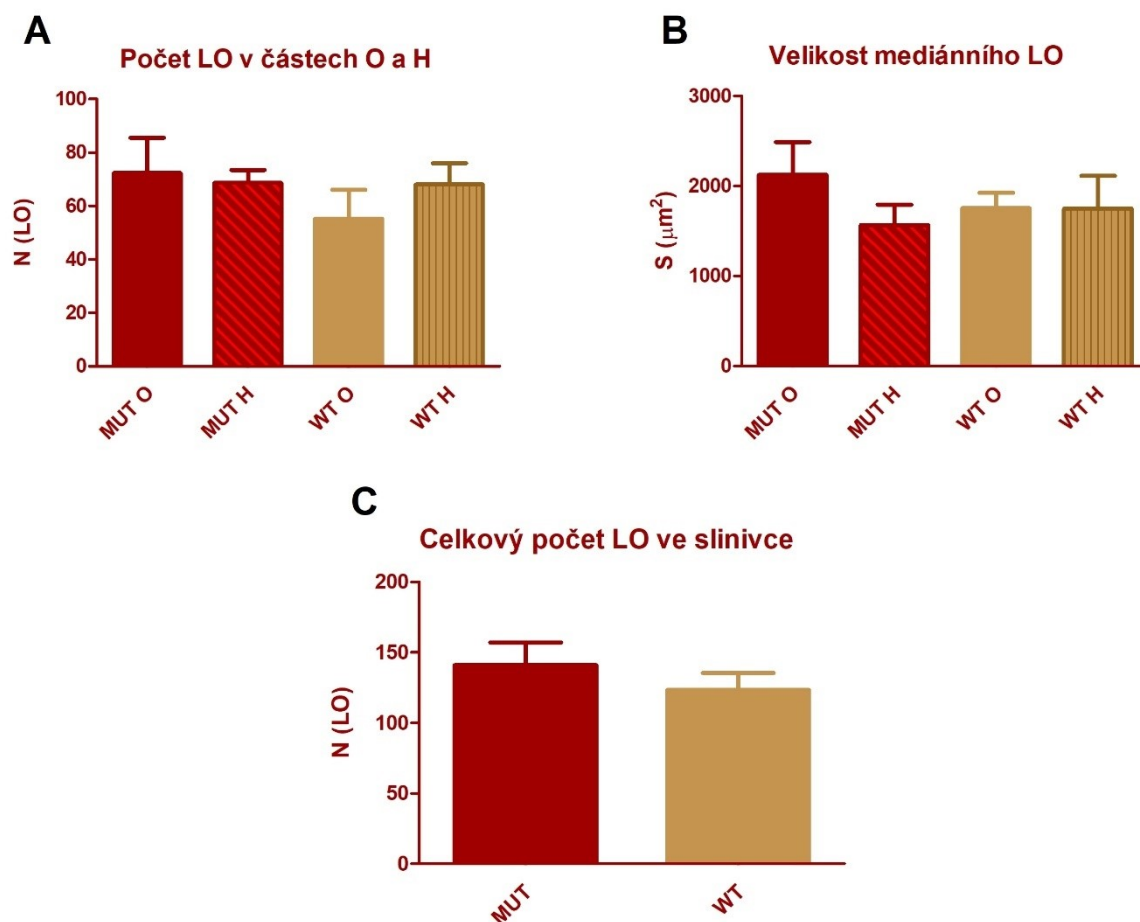
CTRL- kontrolní buňky vystavené bazální glykémii, CTRL+glu – kontrolní buňky v médiu o zvýšené glykémii, siNOX4- silencované buňky vystavené bazální glykémii, siNOX4+glu – silencované buňky v médiu o zvýšené glykémii, SCR- kontrolní buňky silencingu scramble vystavené bazální glykémii, SCR+glu – kontrolní buňky silencingu scramble v médiu o zvýšené glykémii, OVER- overexprimované buňky vystavené bazální hodnotám glykémie, OVER+glu – overexprimované buňky vystavené zvýšené glukémii, PLAZ- kontrolní buňky overexprese plazmid vystavené bazální hodnotám glykémie, PLAZ+glu – kontrolní buňky overexprese v médiu o zvýšené

glykémii. Výsledky jsou průměrem \pm SEM. Počet N vzorků v kategoriích = 3. Bazální výlev inzulinu u siNOX4 vs. SCR *, $P < 0,05$. Koncentrace inzulinu siNOX4+glu vs. SCR+glu *, $P < 0,05$.

Vliv NOX4 na architekturu – počet a velikost Langerhansových ostrůvků

Hlava vs. Ocas slinivky

Předešlé výsledky ukazují, že *Nox4* silencované β buňky mají nižší výlev inzulinu po akutním nárůstu koncentrace glukózy (při GSIS), což je jeden z diabetických znaků. Jedním z dalších je změna ve velikosti LO. Proto jsme se zaměřili na studium odlišností architektury LO u našich mutantních myší s delecí NOX4 v β buňkách. Slinivka se dělí na dvě základní anatomické části hlavu (H) a ocas (O), mezi kterými se mohou počty LO lišit. V lidské slinivce je statisticky dvakrát více LO v ocasní části a v průběhu rozvoje T2DM u lidí dochází preferenčně k úbytku LO v části hlavy (Wang et al., 2013). Vzhledem k počtu plánovaných analýz (dělení myší dle stáří, diety a přítomnosti *Nox4*) jsme zjišťovali, zda odlišnosti v počtu ostrůvků v jednotlivých anatomických částech platí také u našeho myšího kmene, viz. graf č. 12. V rozmístění LO uvnitř jednotlivých anatomických částí jsme ani u jedné ze skupin kontroly wildtype (WT) a mutant (MUT) nepozorovali výrazný rozdíl (**A**). V ocasní části mutantní myši bylo $72,33 \pm 13,13$ ostrůvků, v její hlavové části $68,67 \pm 4,807$ ostrůvků. U kontrolní myši se v ocasní části nacházelo v průměru $55,33 \pm 10,67$ ostrůvků a v části hlavy $68,00 \pm 7,937$ ostrůvků. Co se týče velikosti těchto ostrůvků (**B**), mediánní (střední) ostrůvek byl v ocasní části slinivky mutantní myši veliký $2127 \pm 361,3 \mu\text{m}^2$ a v hlavové části $1566 \pm 228,5 \mu\text{m}^2$. U kontrolní myši se mediánní ostrůvek ocasní části pohyboval okolo $1756 \pm 171,1 \mu\text{m}^2$ a v části hlavy $1750 \pm 364,3 \mu\text{m}^2$. Celkový počet Langerhansových ostrůvků ve slinivce (**C**) činil u mutantních myší zhruba 141 ± 16 ostrůvků a u kontrolních myší $123,3 \pm 12,03$ ostrůvků. Nenalezli jsme statistický rozdíl v rozložení, počtu ani velikosti LO u kontrolních a mutantních zvířat. Pro další analýzu jsme proto použili řezy celou slinivkou bez ohledu na její dělení na hlavu a ocas.



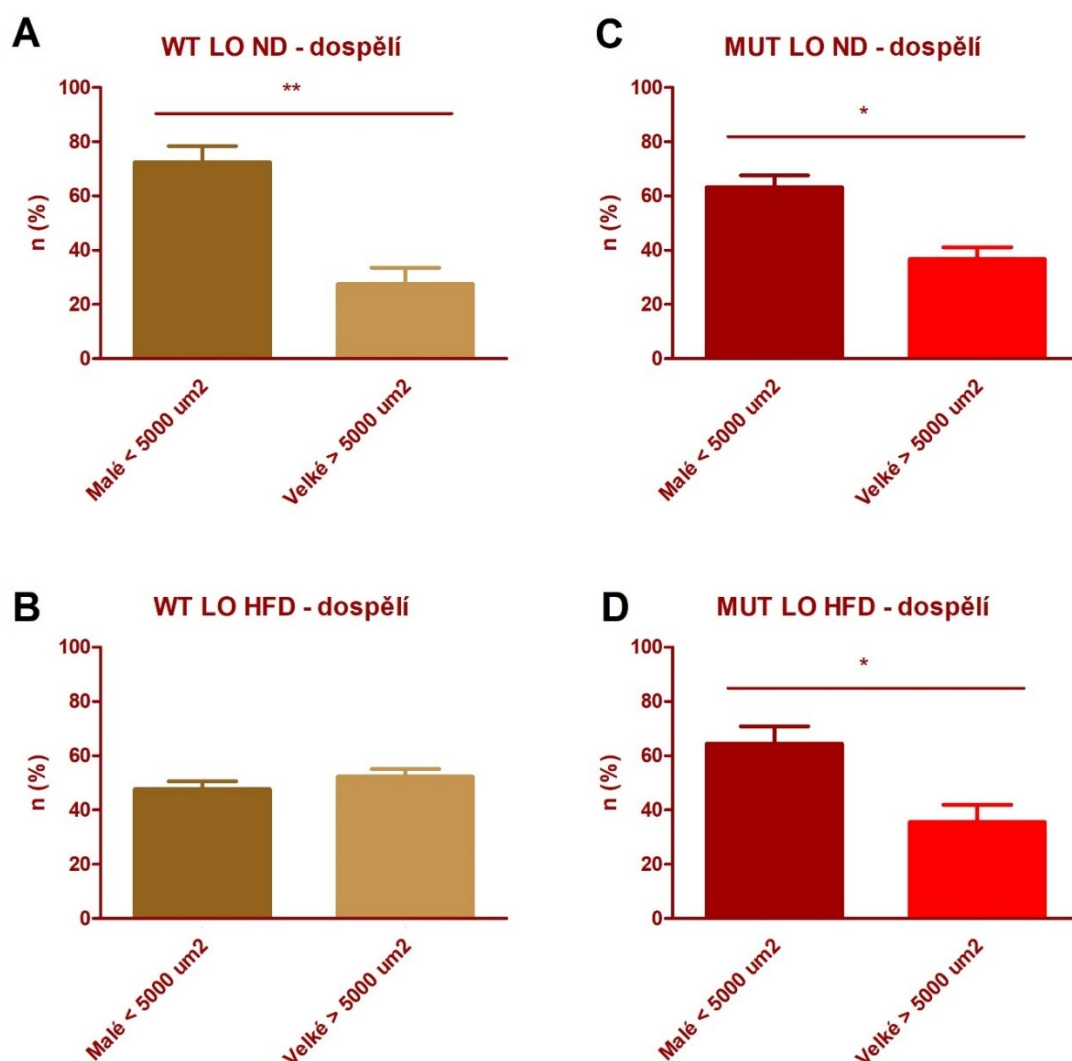
Graf č. 12: Vliv NOX4 na rozmístění LO uvnitř slinivky myši (A), velikost mediánního LO (B) a celkový počet LO ve slinivce (C) u myši

LO – Langerhansův ostrůvek, O – ocas slinivky, anatomická část, H – hlava slinivky, anatomická část. Výsledky jsou průměrem \pm SEM. Počet N vzorků v kategoriích = 3.

Dospělé kontrolní (WT) vs. mutantní (MUT) myši

Architekturu LO jsme charakterizovali z hlediska velikosti LO u dospělých osmítýdenních myši a zjišťovali vliv redoxního stavu β buněk. Jako pozitivní kontrolu, tedy slinivky s předpokládanou hypertrofií LO, jsme zvolili wildtype (WT) myš na vysoce tukové dietě (HFD). Zároveň jsme také sledovali vliv HFD na mutantní myš, viz. graf č 13. Zaměřili jsme se na roli diety, která ovlivňuje celkový metabolismus zvířat. Většina LO se pohybuje na histologických řezech v ploše do $2\,000\,\mu\text{m}^2$ a průměru zhruba $116\,\mu\text{m}$ (Kim et al., 2010). Na základě výsledků procentuálního zastoupení velikosti LO u kontrolních WT myši na normální dietě (A) jsme rozdělili LO na malé (do $5\,000\,\mu\text{m}^2$) a velké (nad $5\,000\,\mu\text{m}^2$). U této skupiny myši byla naprostá většina LO malá ($72 \pm 6,024\%$) a velké LO tvořily zhruba čtvrtinu ($27,53 \pm 6,024\%$). Převaha malých LO byla vůči velikým statisticky významná ($P = 0,0062$). Vysokotuková dieta (HFD, z angl. *high fat diet*) u kontrolních myši (B) vyvolává tzv. diabetický fenotyp, což znamená nárůst tukové tkáně, dyslipidémii, inzulinovou rezistenci a poruchu inzulinového výlevu

(Valle et al., 2011) (Carlsson et al., 1999) . Rozvoj hyperplázie a nárůst počtu velikých LO jsme si ověřili u našich myší, kdy počet velikých LO vzrostl takřka dvojnásobně (na $52,27 \pm 2,881$ %) a podíl malých LO se adekvátně snížil ($47,73 \pm 2,881$ %). U mutantních myší na normální dietě (C) převažovalo procento malých LO ($63,27 \pm 4,391$ %) nad velkými LO ($36,73 \pm 4,391$), což byl méně výrazný rozdíl, než je tomu u kontrolních myší ($P = 0,0129$). U mutantních myší na ND se proti jejich kontrole tedy snižuje množství malých LO a vrůstá počet velikých LO. Vysokotuková strava u mutantních myší (D) nevedla k dalšímu poklesu podílu malých LO ($64,47 \pm 6,409$ %) na úkor velikých LO ($35,53 \pm 6,409$). Tedy hyperplázie LO u mutantních myší působením HFD se neprojevila. Statisticky byl jejich poměr stále významný ($P = 0,0331$), na rozdíl od jejich kontroly (viz. B) wildtype myší na HFD.

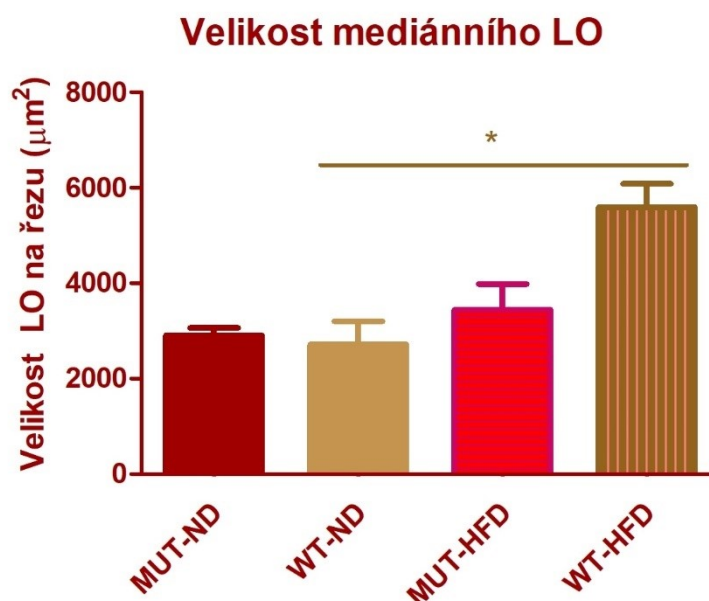


Graf č. 13: Vliv NOX4 na velikost LO u dospělých WT myší na ND (A), WT myší na HFD (B), MUT myší na ND (C) a MUT myší na HFD (D)

WT – wildtype, MUT – mutant, LO – Langerhansův ostrůvek, ND – normální sacharidová dieta, HFD – vysokotuková dieta. Výsledky jsou průměrem \pm SEM. Počet N vzorků v každé kategorii = 3. (A) malé LO vs. velké LO **, $P < 0,01$. (C) malé LO vs. velké LO *, $P < 0,05$. (D) malé LO vs. velké LO *, $P < 0,05$.

Medián povrchu LO dospělých myší

Mediánní („střední“) LO odráží velikost ostrůvků ve slinivce pokusných zvířat. Podobně jako u předchozího grafu jsme zde sledovali vliv redoxního prostředí na nárůst velikosti LO v závislosti na dietě u dospělých zvířat, viz. graf č. 14. Mediánní LO u mutantních myší na normální dietě ($2909 \pm 151,7 \mu\text{m}^2$) byl podobný mediánu ostrůvků u wildtype myší na normální dietě ($2719 \pm 484,8 \mu\text{m}^2$). Na vysoce tukové dietě u mutantů mírně stoupla velikost mediánu ($3443 \pm 543 \mu\text{m}^2$), což ovšem nebylo nijak statisticky významné. U wildtype myší na vysoce tukové dietě („diabetických myší“) vzrostla velikost mediánního LO znatelně ($5594 \pm 490,2 \mu\text{m}^2$), což byl proti původní velikosti zdravých myší významný nárůst ($P = 0,0140$).



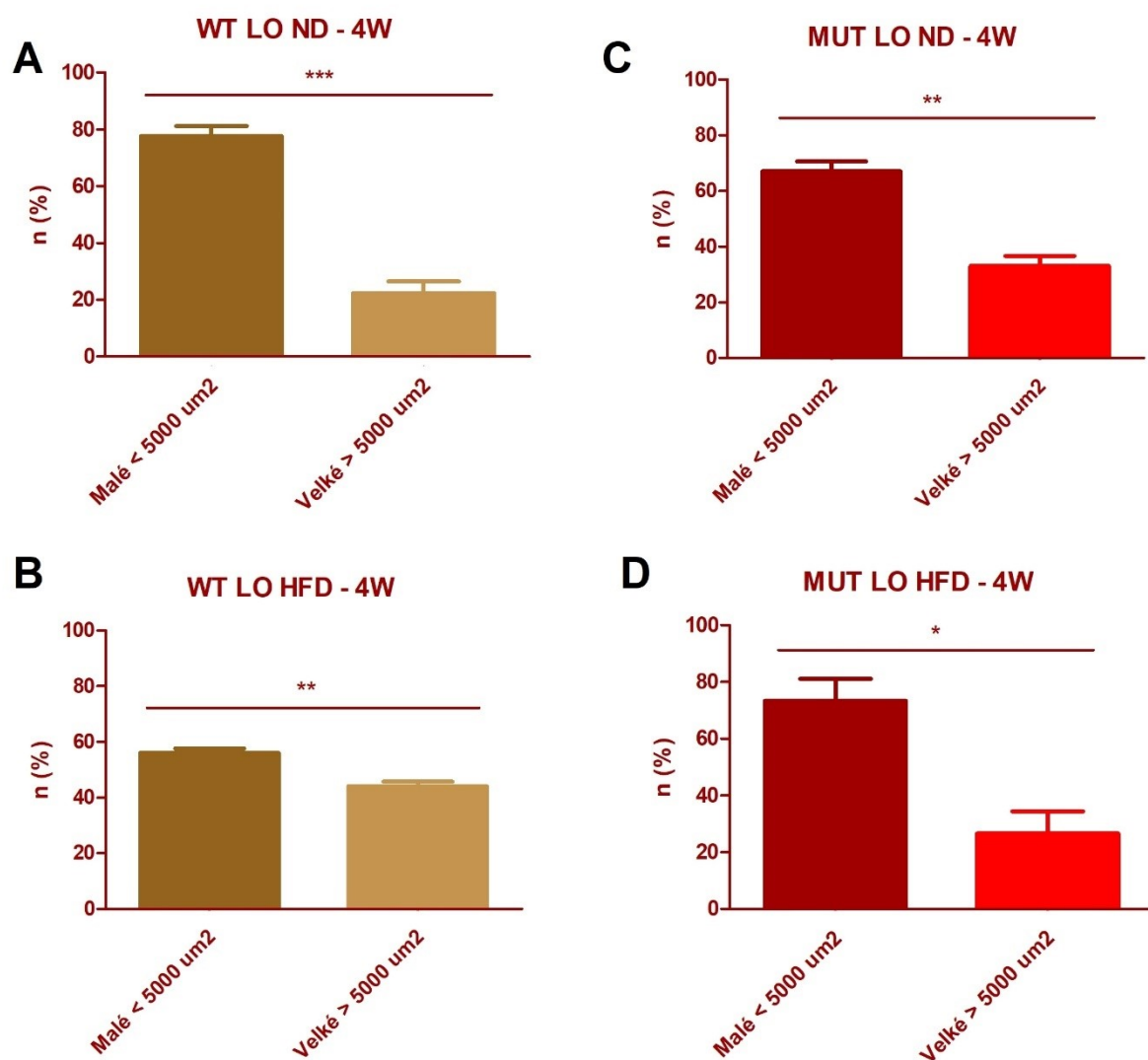
Graf č. 14: Velikost mediánních LO u dospělých WT a MUT myší na ND a HFD

WT – wildtype, MUT – mutant, LO – Langerhansův ostrůvek, ND – normální sacharidová dieta, HFD – vysokotuková dieta. Výsledky jsou průměrem \pm SEM. Počet N vzorků v každé kategorii = 3. WT-ND vs. WT-HFD *, $P < 0,05$.

Mladé čtyřtýdenní myši

Abychom zjistili, zda NOX4 má vliv na zvýšenou/sníženou velikost LO již od narození a tento fenotyp nezpůsobuje adaptace jedince na změnu složení stravy po odstavu, analyzovali jsme slinivky čtyřtýdenních myší, jejichž matky byly minimálně po dobu 8 týdnů krmeny normální (ND) či vysoce tukovou (HFD) stravou, tedy v době těhotenství a následně v době kojení před odstavením mláďat, viz. graf č. 15. Tyto čtyřtýdenní myši měly tedy kromě kojení možnost se přikrmovat ND a HFD. U kontrolních myší s ND (A) významně převažovaly malé LO ($77,67 \pm 3,528 \%$) nad velkými ($22,33 \pm 4,096 \%$) ($P = 0,0005$). U kontrolních myší matek krmených HFD (B) malé LO ($56,00 \pm 1,732 \%$) zaujímaly i přes značný nárůst procenta velkých LO ($44,00 \pm 1,732 \%$) větší podíl ($P = 0,0080$). U mladých mutantních myší matek na ND (C) převládaly malé LO ($67,00 \pm 3,606 \%$) nad velkými LO ($33,00 \pm 3,606 \%$) ($P =$

0,0026). V porovnání s wildtype kontrolou na ND se poměr malých LO snížil na úkor velikých LO (A vs. C). Podobně tomu bylo u mutantních myší na HFD (D), kde rozdíl mezi malými ($73,33 \pm 7,753$ %) a velkými ($26,67 \pm 7,753$ %) LO byl méně významný ($P = 0,0131$). HFD ale u mutantních myší dále nepřispívala k hyperplazii LO, jako tomu je u kontrolních myší (D vs. C oproti B vs. A).

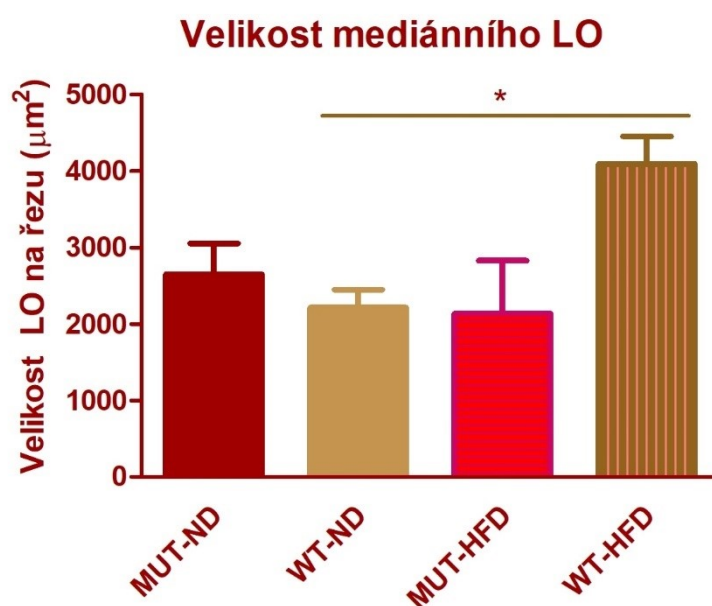


Graf č. 15: Vliv NOX4 na velikost LO u 4týdenních WT myší na ND (A), WT myší na HFD (B), MUT myší na ND (C) a MUT myší na HFD (D)

WT – wildtype, MUT – mutant, LO – Langerhansův ostrůvek, ND – normální sacharidová dieta, HFD – vysokotuková dieta, 4W – čtyř-týdenní myši. Výsledky jsou průměrem \pm SEM. Počet N vzorků v každé kategorii = 3. (A) malé LO vs. velké LO ***, $P < 0,0001$. (B) malé LO vs. velké LO **, $P < 0,01$. (C) malé LO vs. velké LO **, $P < 0,01$. (D) malé LO vs. velké LO *, $P < 0,05$.

Medián povrchu LO mladých čtyřtýdenních myší

Podobně jako u dospělých myší jsme sledovali velikost mediánního („středního“) LO, která odráží velikost ostrůvků ve slinivce pokusných čtyřtýdenních zvířat a vliv diety a redoxního prostředí, viz. graf č. 16. Mediánní LO u mutantních myší na normální dietě ($2647 \pm 406,9 \mu\text{m}^2$) byl podobný mediánu ostrůvků u kontrolních myší na normální dietě ($2213 \pm 237,2 \mu\text{m}^2$) a mediánu LO mutantů na tukové dietě ($2135 \pm 693,7 \mu\text{m}^2$). U kontrolních myší na vysoce tukové dietě („diabetických matek“) vzrostla velikost mediánního LO ($4094 \pm 359,7 \mu\text{m}^2$), což je proti velikosti mediánu LO u zdravých kontrolních myší významný nárůst ($P = 0,0120$).

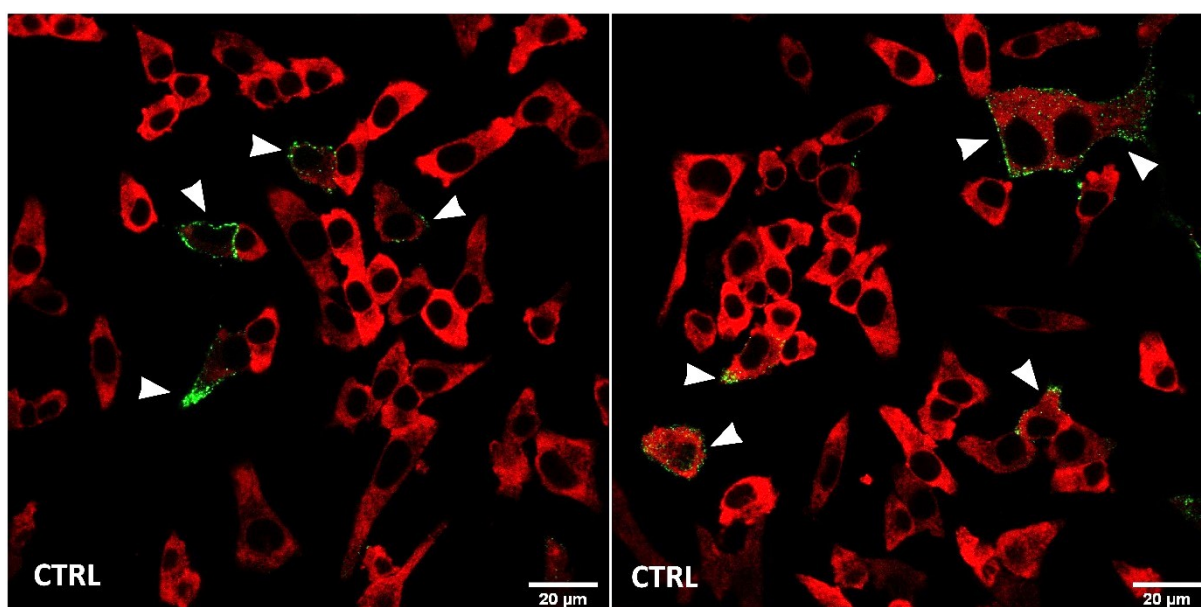


Graf č. 16: Velikost mediánních LO u čtyřtýdenních WT a MUT myší na ND a HFD

WT – wildtype, MUT – mutant, LO – Langerhansův ostrůvek, ND – normální sacharidová dieta, HFD – vysokotuková dieta. Výsledky jsou průměrem \pm SEM. Počet N vzorků v každé kategorii = 3. WT-ND vs. WT-HFD *, $P < 0,05$.

Vliv NOX4 na expresi glukagonu a inzulinu v INS-1E buňkách

Uvnitř LO se vyskytují populace β buněk lišící se v metabolismu, genové expresi a sekreci hormonů. Po dediferenciaci β buněk se u diabetických pacientů objevují tzv. přeprogramované β buňky produkující inzulin i hormon glukagon (White et al., 2013), antagonistický hormon inzulinu charakteristický pro α buňky LO. Parakrinní produkce glukagonu v LO stimuluje u β buněk sekreci inzulinu (Kawai et al., 1995). Vzhledem k zjištěným odlišnostem v sekreci inzulinu u *Nox4* silencovaných β buněk jsme se rozhodli zjistit, jak se v produkci glukagonu liší *Nox4* silencované a overexprimované buňky. Zafixované INS-1E β buňky jednotlivých skupin jsme proto analyzovali pomocí imunocytochemie s primárními protilátkami proti inzulinu (**červeně**) a glukagonu (**zeleně**) (viz. metodiky a seznam chemikálií). Výsledky reprezentují vždy dva snímky z každé kategorie, viz. obrázek 9-11. U všech pozorovaných vzorků jsme zaznamenali přítomnost β buněk pozitivních na glukagon.

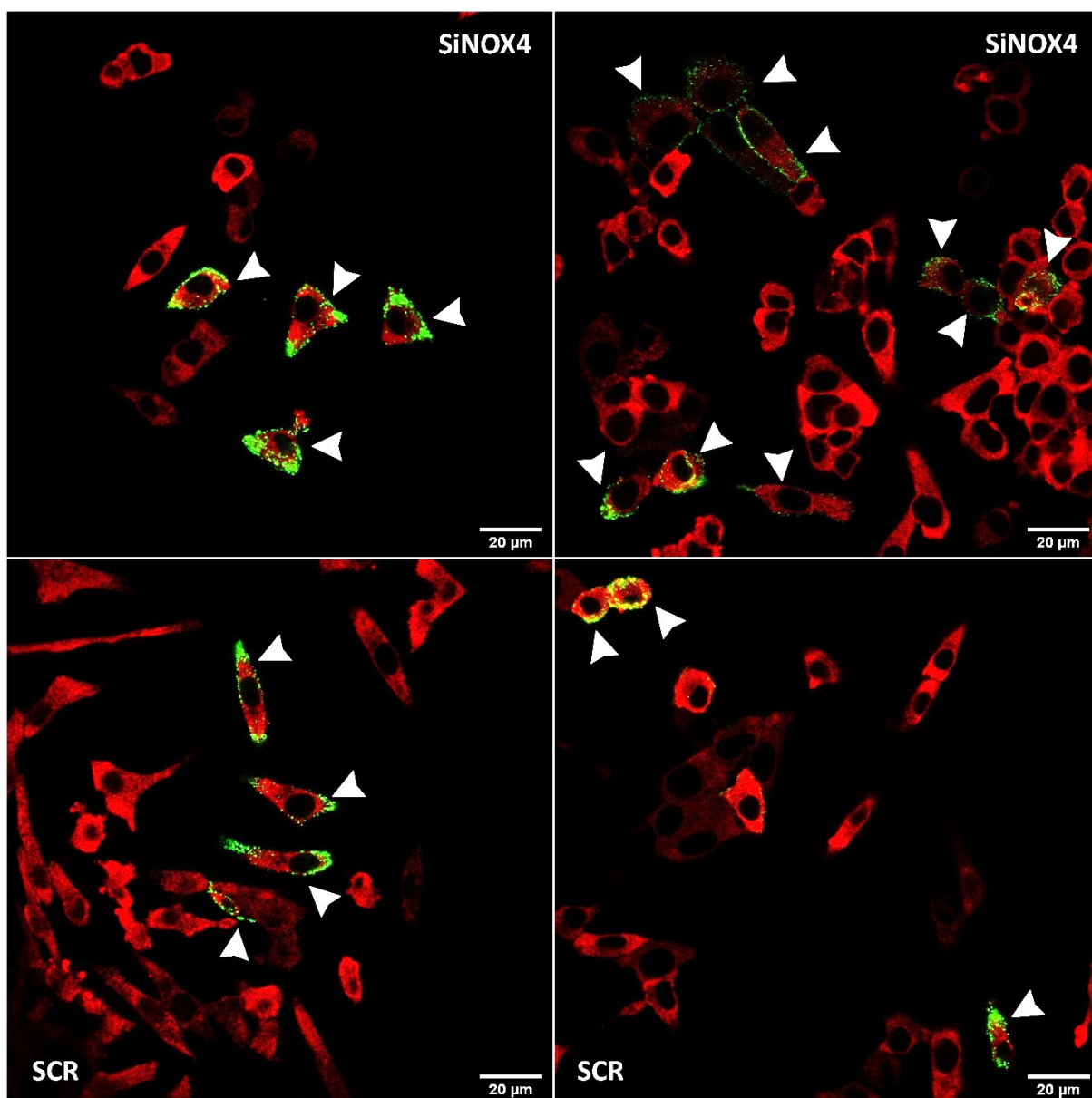


Obrázek č. 9: Vliv NOX4 na sekreci glukagonu z kontrolních β buněk INS-1E

CTRL – kontrola. Snímek pořízen na konfokálním mikroskopu Leica, SPE L2774, objektiv 63x (olejový). Primární protilátka proti glukagonu 1: 500, inzulinu 1: 2000. Sekundární protilátky 1: 1000. Pokus proveden 2x.

INZULIN

GLUKAGON

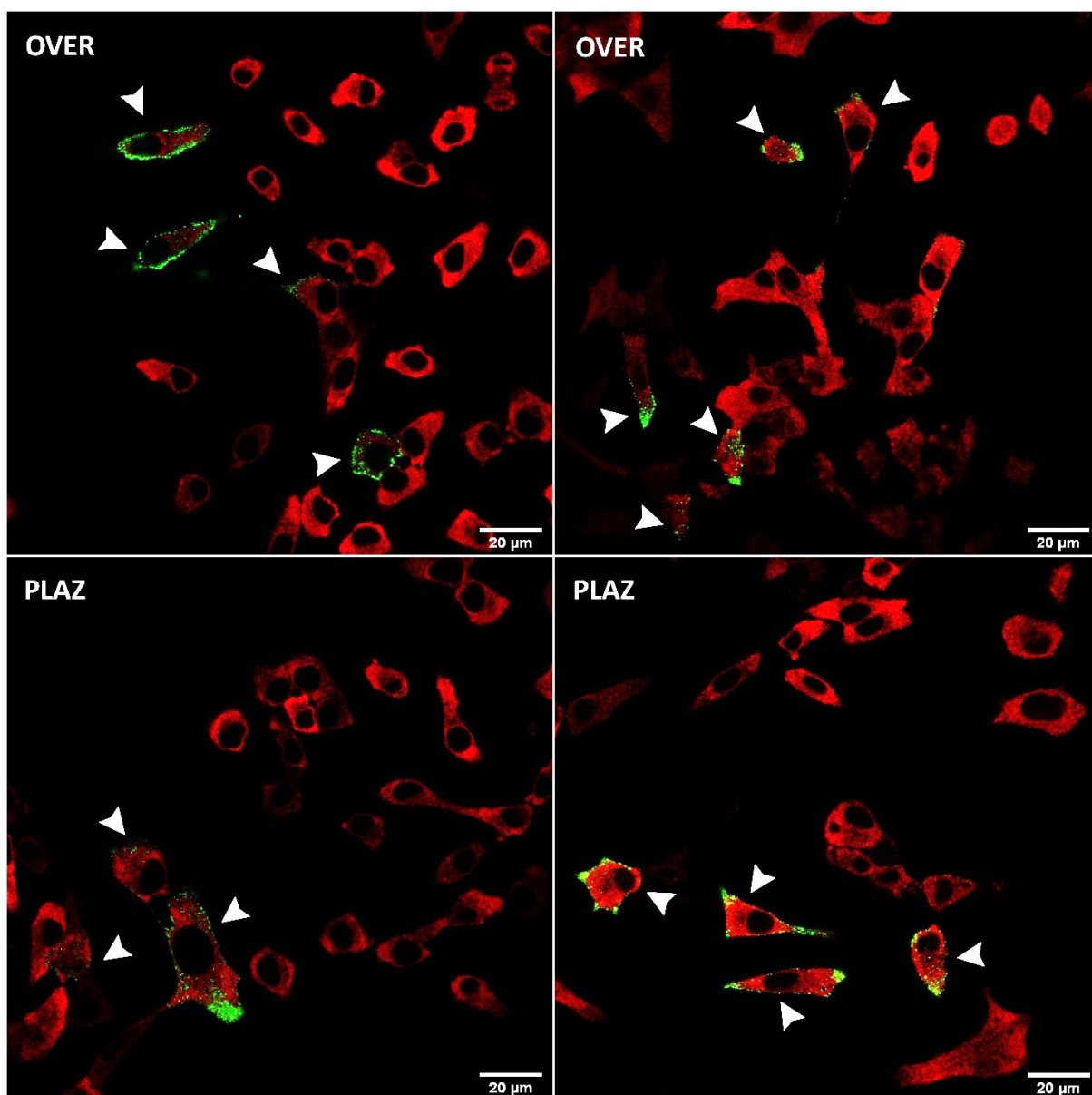


Obrázek č. 10: Vliv NOX4 na sekreci glukagonu z SiNOX4 a SCR β buněk INS-1E

SiNOX4 – Nox4 silencované buňky, SCR – scramble, negativní kontrola silencingu. Snímek pořízen na konfokálním mikroskopu Leica, SPE L2774, objektiv 63x (olejový). Primární protilátka proti glukagonu 1: 500, inzulinu 1: 2000. Sekundární protilátky 1: 1000. Pokus proveden 2x.

INZULIN

GLUKAGON



Obrázek č. 11: Vliv NOX4 na sekreci glukagonu u OVER a PLAZ β buněk INS-1E

OVER – Nox4 overexprimované buňky, PLAZ – negativní kontrola overexprese. Snímek pořízen na konfokálním mikroskopu Leica, SPE L2774, objektiv 63x (olejový). Primární protilátka proti glukagonu 1: 500, inzulinu 1: 2000. Sekundární protilátky 1: 1000. Pokus proveden 2x.

INZULIN

GLUKAGON

8. Diskuze

Naše výsledky ukázaly, že NOX4 exprese je indukována hladinou glukózy v β buňkách. Dále, že snížení hladiny mRNA *Nox4* v INS-1E β buňkách vede k nárůstu hladiny mRNA transkripčního faktoru PDX1, vzrůstu obsahu proinzulinu, nikoliv však zralého inzulinu, dále pak ke zvýšení bazálního výlevu inzulinu a k poklesu výlevu po indukci glukózou (GSIS). U *Nox4* silencovaných buněk je porušena základní funkce β buněk, schopnost výlevu inzulinu jako odpověď na nárůst glykémie. To je jeden ze základních diabetických znaků, ke kterým se dále řadí také hypertrofie LO, jakožto kompenzační mechanismus nedostatku sekretovaného inzulinu. Abychom objasnili možnou roli NOX4 i v tomto případě, analyzovali jsme vliv delece NOX4 v β buňkách na architekturu LO myší, zejména vliv na jejich počet a velikost. Zjistili jsme, že zatímco osmitýdenní vysokotuková dieta u dospělých kontrolních myší vyvolává diabetický fenotyp a strmý nárůst ve velikosti LO, u mutantních myší zůstává velikost LO stejná, jaká je při sacharidové stravě. Míra velikých LO je u mutantních zvířat na obou dietách vyšší než u zdravé kontroly. Podobný efekt přítomnosti NOX4 na velikost LO u mutantních myší jsme sledovali u mladých, čtyřtýdenních myší, což znamená, že v průběhu čtyřtýdenní adaptace na stravu hypertrofie u mutantních myší nevzrůstá. Naše výsledky potvrdily předchozí poznatky o významu NOX4 ve správné funkci β buněk (Plecita-Hlavata et al., 2020) a poukázaly na možné mechanismy jeho vlivu. Nepodařilo se nám prokázat vliv NOX4 na expresi transkripčního faktoru *MafA* ani enzymů inzulinového sestřihu a maturace *Pc1*, *Pc2* a *Cpe*.

Vliv glukózy na expresi *Nox4* v INS-1E β buňkách

NOX4 je oxidáza typická pro ledviny, kde byl pozorován pozitivní vliv 25 mM glukózy na její genovou expresi (Sedeek et al., 2010). Abychom ověřili tento vztah také v β buňkách a možnou roli NOX4 v mechanismu vnímání glukózy, vystavili jsme INS-1E buňky taktéž 25 mM glukóze a sledovali změnu v hladinách mRNA pro NOX4 v čase v porovnání s kontrolou v klasickém inkubačním médiu s 11 mM glukózou. Potvrdili jsme pozitivní vliv akutního zvýšení glykémie. Již po 30 minutách v 25 mM glukóze se exprese zvýšila v průměru o 32,2 % a po 1 hodině o 82,6 %. Po dvou hodinách se vrátila zpět do běžných hodnot genové exprese.

Zjistili jsme, že akutní zvýšení glykémie vyvolává navýšení transkripce *Nox4* v intaktních INS-1E β buňkách, podobně jako je tomu v ledvinách. Tam NOX4 reguluje syntézu erythropoetinu a funguje tak jako senzor nízké hladiny O_2 (Geiszt et al., 2000). Podobnou senzorickou funkci má NOX4 v plicních NEB buňkách (Wang et al., 1996). Stejně jako v ostatních buněčných typech by enzym NOX4 v β buňkách mohl mít senzorickou funkci, např. spojenou s hladinou glukózy či inzulinu.

Jsme si vědomi rozdílu použité hladiny glukózy u tohoto pokusu vůči následujícím analýzám. Na rozdíl od následujících pokusů jsme v tomto případě použili zvýšenou 25 mM glukózu, jako tomu bylo u studie na ledvinách, ze které jsme vycházeli. Pokud bychom tento pokus provedli podruhé, zvolili

bychom hladiny glykémie shodné s následujícími analýzami (tedy 2,5 mM a 16,5 mM), ačkoli pokládáme naše ověření vlivu glukózy na hladinu mRNA *Nox4* za vyhovující. U INS-1E buněk působení 15-20mM glukózy vyvolává stejný účinek na míru výlevu inzulinu (na křivce výlevu pozorujeme plateau) (Merglen et al., 2004). U potkaních β buněk izolovaných z LO se mezi hodnotami 15-30mM glykémie míra výlevu inzulinu nemění (plateau), ačkoli dlouhodobá kultivace (24 hodin) by vedla k narušení běžných mechanismů (Rebelato et al., 2018).

Analýza obsahu *Nox4* mRNA a proteinu NOX4

V INS-1E β buňkách jsme pomocí dvojice specifických siRNA oligonukleotidů snížili hladinu mRNA pro NOX4. Úspěšnost silencingu jsme potvrdili analýzou profilu mRNA metodou RT-PCR. U silencovaných buněk hladina mRNA pro NOX4 tvořila v průměru 29 % původní exprese oproti kontrole. K ověření specifity a vlivu transfekčních činidel jsme vytvořili negativní kontrolu scramble s nevazebnou siRNA sekvencí, kde byla exprese *Nox4* proti normální expresi o 7 % vyšší. Simultánně jsme vytvořili skupinu buněk s overexprimovaným genem pomocí transfekce expresním plazmidem s genem *Nox4*. Zde byl nárůst v hladině *Nox4* mRNA v průměru o 9492 %. K dalšímu studiu účinků overexprese a vedlejších účinků transfekce byla vytvořena negativní kontrola buněk transfekovaných prázdným plazmidem, kde se hladina mRNA pro NOX4 pohybovala o 7,5 % nad běžnou expresí. Analýza mRNA u negativních kontrol vyloučila vliv transfekčních činidel a chemikálií na genovou expresi *Nox4*.

Úspěšnost genových manipulací jsme se rozhodli ověřit pomocí semikvantifikační metody stanovení obsahu proteinu NOX4 v lyzátu buněk. Monoklonální primární protilátka proti NOX4 (ab133303, Abcam) se ukázala být nefunkční při použití pozitivních kontroly: lyzátu potkaních ledvin. Vzhledem k tomu, že ledviny jsou tkání s nejvyšší expresí *Nox4* a v dospělosti se zde exprimuje v malém množství také *Nox2* a *Nox1* (NCBI, 2020; NCBI, 2020), není pravděpodobné, že by onen označený protein protilátkou ab133303 byla jiná NOX izoforma v β buňce. Pozorovanou imunoreaktivitu protilátky ab133303 u vzorků lyzátu β buněk a nikoli u pozitivní kontroly si tak vysvětlujeme jako nespecifickou reakci s neznámým proteinem o molekulární hmotnosti blízké hmotnosti NOX4 (63 kDa). Námi použitá metoda silencingu patří mezi standardně používané postupy na našem oddělení, jejíž úspěšnost se kolegům povedla ověřit s použitím odlišné funkční primární protilátky (Plecita-Hlavata et al., 2020). Tato funkční primární protilátka je již několik let nedostupná. Další komerční protilátky i protilátky z jiných laboratoří, které jsme vyzkoušeli, bohužel neprokázaly specifitu k NOX4 proteinu.

Bohužel kvůli nedostatku funkčních primárních protilátek na trhu není možné ověřit zvýšený obsah proteinu u skupiny overexprese. Dle našich dalších pokusů se zdá, že snahy o overexpresi NOX4 nevyvolaly v buňkách výrazné změny námi zkoumaného fenotypu. To může být způsobeno nedostatkem translatovaného proteinu, např. vnitřními mechanismy buňky na potlačení syntézy proteinu NOX4, či jeho zvýšené degradace. Vzhledem k množství vytvářeného inzulinu mohlo dojít k

dosažení hraniční kapacity translační mašinerie. Aktivita NOX4 je regulovaná mimo přísunu substrátu do značné míry genovou expresí na úrovni mRNA. Tu regulují mimo hlavních transkripčních faktorů miRNA-25 (potvrzeno v ledvinách) (Fu et al., 2010) a miRNA-146a (potvrzeno v endotelu) (Vasa-Nicotera et al., 2011). Jejich koncentrace stoupají v období metabolického stresu při stárnutí a rozvoji cukrovky (Fu et al., 2010; Vasa-Nicotera et al., 2011). Hladiny *Nox4* mRNA pozorované u overexprimovaných buněk vysoce převyšovaly běžnou koncentraci a odpovídající produkce H_2O_2 by silně převýšila bezpečné fyziologické koncentrace. To mohlo na buněčné úrovni vést k metabolickému stresu, který by vedl k nárůstu syntézy kontrolních miRNA a potlačení syntézy proteinu, popř. k aktivaci dosud neidentifikovaných mechanismů vedoucích k destrukci nadbytečných NOX4 v proteazomu. Dalším možným vysvětlením je úspěšná overexprese a nárůst obsahu NOX4, která ovšem nevedla k ovlivnění fenotypu díky neúměrné aktivitě. NOX4 aktivita nemusí nutně odpovídat celkovému obsahu proteinu v buňce, protože je závislá na lokálních koncentracích jeho substrátu v místě lokalizace. Bylo by proto vhodné změřit u buněk s nadproduktovanou NOX4 skutečnou aktivitu NOX4. Metoda měření aktivity je poměrně nespecifická, ale díky použití specifického inhibitoru NOX4, lze odhadnout právě aktivitu NOX4.

Vzhledem k uvedeným skutečnostem si dovoluujeme tvrdit, že silencing byl úspěšný a vedl k poklesu mRNA a pravděpodobně také proteinu NOX4 v buňce, což se odrazilo na fenotypu buněk. U skupiny overexprese nedokážeme s jistotou potvrdit míru ovlivnění hladiny proteinu v buňce a vzrůstu aktivity NOX4, kvůli nepotvrzené úspěšnosti nové metody na našem oddělení. Rádi bychom v budoucnu změřili tuto aktivitu.

Změny v genové expresi genů inzulinu a jeho základních transkripčních faktorů

V buňkách ledvin byla NOX4 potvrzena také na jaderné membráně (Wang et al., 2018), kde se může účastnit přímých regulací genové exprese, transportu a stability transkripčních faktorů. Základní transkripční faktory inzulinu PDX1 a MAFA a jejich geny jsou známy svou náchylností k zvýšené produkci ROS v β buňce v průběhu progresu cukrovky (Olson et al., 1995; Sharma et al., 1995; Tanaka et al., 1999; Harmon et al., 1999; Harmon et al., 2005). Naše analýza mRNA ukazuje statisticky významný vliv snížení hladiny NOX4 na expresi *Pdx1*. Silencing *Nox4* o úspěšnosti 71 % vedl k nárůstu mRNA pro *Pdx1* v průměru o 142 %. Tento výsledek je zatížen vysokou odchylkou, ovšem trend je shodný u všech porovnaných vzorků, a proto nabývá na statistickém významu. Vysoký rozptyl může být způsoben nízkým počtem vzorků. Zdá se tedy, že běžná koncentrace NOX4 při normoglykémii negativně reguluje hladiny *Pdx1* mRNA a snížení hladin NOX4 vede k nárůstu exprese *Pdx1*. Vzhledem k citlivosti genové exprese *Pdx1* k oxidačnímu stresu jsme u overexprimovaných buněk předpokládali úbytek mRNA. Reálně naměřené hodnoty ovšem odpovídali negativní kontrole a pohybovaly se v běžných hladinách. Pravděpodobně tak overexprese nevedla ke zvýšené produkci H_2O_2 , ať už vlivem

snížené aktivity NOX4, snížené tvorby proteinu vlivem miRNA či dalších dosud neznámých mechanismů.

Ohledně hladin mRNA druhého nejdůležitějšího transkripčního faktoru MAFA se nám nepodařilo objevit jasný trend role NOX4. U silencovaných buněk i jejich negativní kontroly byla exprese *MafA* zvýšena (konkrétně o 62,6 % u silencovaných buněk a o 37,5 % u jejich negativní kontroly). Naše výsledky nevedly k jednoznačnému závěru, jak snížená hladina NOX4 ovlivňuje expresi *MafA*, vzhledem k narušení exprese u negativní kontroly. Overexprimované buňky se podobně jako u *Pdx1* pohybovaly v hladinách mRNA *MafA* okolo běžných hodnot podobných negativní kontrole, což může být způsobeno stejnými mechanismy, jako u *Pdx1*.

Oba tyto geny ovlivňují expresi inzulinových genů, proto jsme předpokládali možný zásah do hladin mRNA. Inzulin u krys a myši kódují dva geny *Ins1* a *Ins2*, které jsou regulovány stejnými hlavními transkripčními faktory PDX1, MAFA a NEUROD. Věnovali jsme se zejména genu *Ins1*, jelikož při práci s *Ins2* genem se objevily technické problémy. Hladina mRNA *Ins1* byla u *Nox4* silencovaných vzorků proti kontrole mírně zvýšena (v průměru o 21,3 %, její negativní kontrola pouze o 2,3 %). Podobně zanedbatelně zvýšenou hladinu *Ins1* mRNA měly také overexprimované buňky i s jejich negativní kontrolou (nárůst o 19,2 % u overexprese a o 21,4 % u jejich negativní kontroly). Nezdá se tedy, že by nárůst hladiny mRNA *Pdx1* u *Nox4* silencovaných buněk vzhledem k nestejnoměrnému nárůstu *MafA* mRNA znamenal signifikantní zvýšení exprese *Ins1* genu. Podobné výsledky jsme získali také v pokusu s *Ins2* genem (vzhledem k technickým problémům není bohužel počet vzorků dostatečný pro statistickou analýzu a není uveden ve výsledcích). Získaná data však naznačují, že ani u něj se hladiny mRNA u silencovaných buněk významně nelišily od ostatních vzorků a zůstávaly v běžných hladinách. NOX4 účinky na gen *Pdx1* tak nevedou k nárůstu koncentrace *Ins1* mRNA kódujícího inzulin. Samotný nárůst mRNA pro *Pdx1* u silencovaných buněk nemusí vést k nárůstu produkce inzulinu hned z několika důvodů. Jedním z nich je možný neadekvátní nárůst tvorby proteinu PDX1. Dalším je množství transkripčních faktorů inzulinu. Hladina mRNA druhého zkoumaného nejdůležitějšího faktoru MAFA u silencovaných buněk není výrazně zvýšena. Mimo škálu transkripčních faktorů rozhodují o expresi inzulinu také epigenetické regulace. Demetylace CpG ostrovů na myším *Ins2* a lidském INS promotoru je typická pro maturované funkční β buňky a narušení těchto mechanismů může vést ke snížení produkce mRNA inzulinu nezávisle na hladině transkripčních faktorů (Kuroda et al., 2009). Hladiny mRNA inzulinu ovlivňují stabilizační vazebné proteiny, např. v přítomnosti glukózy protein PTB (z angl. *polypyrimidine tract-binding protein*), který stabilizuje inzulinovou mRNA a vede k nárůstu tvorby proinzulinu a inzulinu (Tillmar et al., 2001). Proto jsme se zaměřili na reálnou produkci proinzulinu a inzulinu v β buňkách.

Vliv narušení redoxní rovnováhy na obsah proinzulinu, inzulinu a jeho výlev

Naším cílem bylo zjistit, jaký má vliv úbytek či nárůst NOX4 v β buňce na jejich funkci – tvorbu proinzulinu, inzulinu a bazální a stimulovaný výlev sekrečních granul. Za bazální neindukující hladinu glykémie jsme považovali 2,8mM koncentraci glukózy a za zvýšenou 16,5mM koncentraci, stejně jako kolegové z dalších laboratoří (Munhoz et al., 2016; Farack et al., 2019). Akutní navýšení glykémie vede k nárůstu v produkci proinzulinu, jeho sestřihu na inzulin a nárůstu výlevu sekrečních granul. Neindukující hladiny glykémie stále vedou k nízké tvorbě proinzulinu a inzulinu, což buňkám umožňuje se připravit v období hladu na nárůst potřeby po příjmu potravy. U pacientů s T2DM a inzulinovou rezistencí dochází vlivem porušení funkce β buněk a snížení jejich sekrece inzulinu k nárůstu bazální tvorby proinzulinu a jeho sekrece do krevní plazmy (Roder et al., 1998).

U NOX4 silencovaných buněk byla bazální tvorba proinzulinu abnormálně zvýšena. Koncentrace při nízké glykémii byla takřka shodná s hodnotami po indukci glukózou. Buňky tak příliš nereagují na indukci glukózou. Snížení hladiny NOX4 a tedy snížení produkce H_2O_2 tak vede při neindukční glukóze ke zvýšení obsahu proinzulinu v buňce, podobně jako je tomu u T2DM diabetických pacientů (Roder et al., 1998). Nárůst produkce proinzulinu může být způsoben zvýšenou poptávkou po inzulinu, snížením sestřihu proinzulinu či poruchu tvorby váčků a jejich sekrece. Tento jev byl popsán u tzv. „extrémních β buněk“ při studiu populací β buněk uvnitř Langerhansových ostrůvků. Extrémní β buňky za bazální glykémie produkují velké množství proinzulinu a pravděpodobně hrají roli zejména v bazální sekreci (Farack et al., 2019). Mimo podobnosti tvorby proinzulinu a výlevu inzulinu se s *Nox4* silencovanými buňkami shodují také ve zvýšené expresi *Pdx1*. Jejich množství se zvyšuje při rozvoji inzulinové rezistence u modelu diabetických myší (db/db, s mutací v leptinovém receptoru), kde hrají pravděpodobně důležitou roli v produkci inzulinu při dlouhotrvající hyperglykémii (Farack et al., 2019). Vzhledem k vysoké variabilitě β buněk a jejich genové expresi je možné, že snížení exprese *Nox4* stojí z části za fenotypem těchto extrémních β buněk. U našich mutantních myší s delecí *Nox4* sledujeme rozvoj inzulinové rezistence a poruchu dvoufázového výlevu inzulinu (Plecita-Hlavata et al., 2020), stejně jako je tomu u db/db myší. Vlivem mutace leptinového receptoru se u db/db myší rozvíjí dyslipidémie, obezita, inzulinová rezistence a T2DM (Kobayashi et al., 2000).

Důležité je také zvážit vliv autokrinního inzulinu. Delece IR v β buňkách vede přímo k rozvoji glukózové intolerance (Kulkarni et al., 1999) a snížení exprese IR pomocí siRNA blokuje GSIS (DaSilva-Xavier et al., 2004). V cílových buňkách (a pravděpodobně tedy i v β buňkách) je NOX4 zapojená do přenosu signálu od IR díky negativním účinkům na protein tyrozin fosfatázy (PTP). Jeho delece a silencing vede ke snížení fosforylace IR a IRS1 a utlumení celé kaskády IR (Mahadev et al., 2004). *Nox4* silencované buňky mají zvýšenou bazální sekreci inzulinových granul, což může souviset s rolí NOX4 v IR kaskádě. NOX4 by mohl sloužit k přenosu signálu od IR a zprostředkování zpětné vazby od autokrinního inzulinu. V jaterních buňkách bez NOX4 se díky účinkům na PTP vyvíjí inzulinová

rezistence, stoupá exprese FOXO a CREB, fosfoenolpyruvát karboxykinázy, glukóza-6-fosfatázy a dalších enzymů, které způsobí glukoneogenezi a hyperglykémii. Absence účinků NOX4 na PTP má tak přímý vliv na metabolismus a genovou expresi (Cheng & White, 2012). V Langerhansových ostrůvcích není prokazatelně produkce proinzulinu nijak spjata s hladinou okolního inzulinu (Wicksteed et al., 2003). Vzhledem k parakrinním signalizacím a inhibičním vztahům jednotlivých hormonů LO se ovšem nedá vyloučit vliv okolních buněk LO.

U ostatních vzorků se hladiny proinzulinu při nízké a zvýšené glykémii takřka nelišily, což je nejspíše způsobeno úspěšným sestřihem na inzulin a sekreci maturovaných váčků do média po zvýšení glykémie. U silencovaných buněk byla hladina proinzulinu po indukci glukózou stejná jako bazální produkce proinzulinu. Jejich schopnost výlevu inzulinu po indukci glukózou byla ovšem rapidně snížena. Tyto buňky nebyly schopny dosáhnout běžné intenzity GSIS, jako tomu bylo u ostatních skupin. Snížení NOX4 tak má přímý vliv na schopnost buněk vnímat nárůst glykémie a reagovat na něj vysokým výlevem inzulinu. Absence NOX4 vede k poruše regulací syntézy proinzulinu v závislosti na hladině glykémie. Pravděpodobně zde H_2O_2 z NOX4 funguje jako přenašeč signálu o koncentraci glukózy a inzulinu v okolí a celkovém metabolickém stavu buňky. Jeho roli podporují pokusy s antioxidantem N-acetyl cysteinem, který snížením hladiny ROS v β buňkách, vedl k celkovému poklesu GSIS (Llanos et al., 2015).

Transfekce plazmidem vedla ke zvýšenému výlevu inzulinu při GSIS u overexprimovaných buněk i jejich negativní kontroly, což poukazuje na možné narušení správné fyziologie vlivem transfekce plazmidem. Obsah inzulinu u overexprimovaných buněk při bazálních hladinách glukózy byl v normě a po jeho výlevu strmě klesl stejně jako u jeho negativní kontroly (15,59 $\mu\text{g/ml}$ u overexprese a 15,31 $\mu\text{g/ml}$ vs. 20,99 $\mu\text{g/ml}$ u kontroly), což koresponduje s vyšším výlevem při GSIS u těchto buněk. Na rozdíl od negativní kontroly, u overexprimovaných buněk byl pokles v obsahu inzulinu po GSIS statisticky významný.

Počet LO a rozložení ve slinivce

Hyperglykémie a inzulinová rezistence v prvních fázích diabetu vedou ke změnám architektury LO. Vzhledem ke zvýšené potřebě inzulinu při hyperglykémii β buňky proliferují (hyperplazie) a dochází k hypertrofii LO (Oligvie, 1933; Kim et al., 2010). Zatímco zdravé myši netrpí nedostatkem inzulinu a jejich LO jsou převážně malé, u myší s tukovou dietou se objevuje nárůst v jejich velikosti ($> 5000 \mu\text{m}^2$), tj. hypertrofii LO. Existují důkazy o preferenční hypertrofii či úbytku LO v jednotlivých anatomických částech slinivky u diabetiků (Wang et al., 2013). Abychom zjistili, jakou roli u myší hraje oxidačně-redukční prostředí β buněk, analyzovali jsme orgány dospělých kontrolních wildtype (β NOX4+/+) a mutantních (β NOX4-/-KO) myší krmených běžnou sacharidovou dietou. Celkový počet LO byl u obou skupin srovnatelný bez významných statistických rozdílů. V průměru obsahovaly slinivky mutantních

samic o několik LO více (zhruba o 18 LO/ slinivku) než kontrolní myši. Abychom vyloučili vliv pohlaví, porovnali jsme tyto výsledky s počtem LO u samců a samic z dalších pokusů. Průměrné počty LO se mezi pokusnými zvířaty v jednotlivých kategoriích nelišily (výsledky nezařazeny). Mezi jednotlivými zvířaty se objevovala významná variabilita v celkovém počtu LO, což se shoduje s dřívějšími intradruhovými a mezidruhovými analýzami (Kim et al., 2010). V průměru se u mutantních myší vyskytovalo více LO v části ocas vůči hlavě, a naopak tomu bylo u zvířat kontrolních, to vše se zcela zanedbatelnými rozdíly. Může to být dáno nedostatečným počtem vzorků a faktem, že veškeré pokusné myši v tomto pokusu byly samice. U nich do značné míry ovlivňuje metabolismus hormonální cyklus (Hellman, 1960). Při porovnání velikosti mediánního ostrůvku, který ilustruje nejlépe reálnou velikost středního LO uvnitř slinivky, jsme u mutantních myší pozorovali nárůst velikosti středního LO v ocasní části, ovšem se zanedbatelným rozdílem způsobeným malým počtem vzorků. Následující analýzy slinivky, jsme se tak rozhodli vést na celých nedělených slinivkách. Tento postup nám umožnil snazší manipulaci s orgány zejména u mladých čtyřtýdenních myší.

Rozdíly architektury LO u dospělých kontrolních a mutantních myší na normální dietě (ND) a vysokotukové dietě (HFD)

Naše výsledky ukazují, že specifická delece NOX4 v β buňkách způsobuje u myší nárůst velikosti LO, který neovlivňuje složení stravy. U zdravých kontrolních myší na ND se většina LO pohybuje ve velikosti do 5 000 μm^2 (měřeno na histologických řezech). Tomu odpovídá i velikost mediánního LO, která se u nich pohybuje okolo 2719 μm^2 . K navození diabetického fenotypu u myší, což znamená k nárůstu hypertrofie LO, inzulinové rezistence a obezity, se využívá dlouhodobé působení HFD (Valle et al., 2011; Carlsson et al., 1999). Již po 8 týdnech dospělé kontrolní myši na HFD vykazují rapidní navýšení množství hypertrofických LO ($> 5\,000\ \mu\text{m}^2$) a to z původních 27,53 % na 52,27 % (z celkového počtu LO ve slinivce) a adekvátní pokles podílu malých LO. Vzrůstá u nich adekvátně velikost mediánního LO na zhruba 5594 μm^2 . Může za to toxické působení současně zvýšené hladiny glukózy a MK v krvi, které způsobí hyperplázii β buněk a hypertrofii celých LO (Oligvie, 1933; Kim et al., 2010) vyvolaný inzulinovou rezistencí cílových tkání (Brüning et al., 1997). Dospělé mutantní myši krmené ND mají proti zdravé kontrole zvýšené množství hypertrofických LO, konkrétně 36,73 % oproti 27,53 % u kontroly na ND. Mediánní LO se u nich pohybuje okolo velikosti 2909 μm^2 . Dospělé mutantní myši se tak co do velikosti LO pohybují mezi hodnotami u zdravých myší a diabetického modelu. Tyto myši mají zjištěnou inzulinovou rezistenci v tuku a svalové tkáni (Plecita-Hlavata et al., 2020), což může vést ke zvýšené produkci inzulinu a mírnému nárůstu hypertrofie LO. Bylo by vhodné ověřit, zda k nárůstu inzulinové rezistence dochází postupně v průběhu života vlivem poruchy β buněk. Dále mají tyto mutantní myši porušen dvoufázový výlev inzulinu (Plecita-Hlavata et al., 2020), což se shoduje s pozorovanými dysfunkcemi *Nox4* silencovaných INS-1E β buněk, u kterých se objevuje zvýšený bazální výlev inzulinu

a pokles výlevu v GSIS proti kontrole. β buňky tak produkují inzulin spíše kontinuálně než v reakci na zvýšení glykémie, což poukazuje na roli NOX4 jako senzoru přítomnosti signálu. Snížení hladiny NOX4 by mohlo vyvolat nárůst aktivity PTP (které NOX4 inhibuje) a snížení fosforylace IR a IRS1 (Mahadev et al., 2004) a tedy rozvoj inzulinové rezistence v β buňkách. Tím by došlo k narušení IR dráhy a snížení aktivity PI_3K/PKB . Poruchu aktivace PKB dráhy, která vede ke zvýšené proteosyntéze, lze sledovat například v ledvinách se sníženou hladinou NOX4 (Gorin et al., 2003). Narušením vnímání hladiny inzulinu v LO, tak β buňky vytvářejí proinzulin kontinuálně, což vede k jejich hyperplázii a zvýšené hypertrofii LO na ND. Pro ověření této hypotézy by bylo vhodné u našich $\beta Nox4KO$ myší ověřit expresi a aktivitu PKB a jejích cílových proteinů.

Zajímavý je efekt HFD u dospělých mutantních zvířat. Zatímco u kontrol vede k rapidnímu navýšení hypertrofie LO, u mutantů zůstává procento hypertrofie takřka shodné s původní hodnotou na ND (35,53 % na HFD vs. 36,73 % na ND). Potvrzuje to také velikost mediánního LO, která se pohybuje okolo $3443 \mu m^2$, tzn. výrazně pod hodnotami mediánu u myší s diabetickým fenotypem. Naše snahy o umocnění diabetického fenotypu (zde hypertrofie LO u mutantů pomocí HFD, která vede k inzulinové rezistenci, obezitě a dyslipidémii) tak zcela selhaly. Tento jev podporuje teorii o zapojení NOX4 do senzorických funkcí β buněk, např. skrze vnímání autokrinního inzulinu, hladiny glykémie, energetického stavu buňky či dalších zatím neznámých mechanismů. Absence NOX4 vede k inhibici rozvoje hypertrofie LO způsobené HFD u mutantních zvířat, jejíž hlavním důvodem je rozvoj inzulinové rezistence. Vliv rozvoje rezistence je nutné ověřit pokusem, kde bychom u mutantních myší na ND a HFD porovnali míru jejich inzulinové rezistence a produkce inzulinu v průběhu života. Možné je výše diskutované zapojení IR, IRS, PTP a PKB dráhy. HFD vede u kontrolních myší ke zvýšení metabolického stresu, inzulinové rezistenci a vyšší produkci inzulinu, která se odrazí v hypertrofii LO. Díky narušení vnímání produkce inzulinu a metabolismu u β buněk mutantních myší se zdá být pravděpodobné, že u nich nedochází ke zvýšení produkce inzulinu při HFD. Tyto buňky jsou již rezistentní k inzulinu a další navýšení jeho produkce, které by se odrazilo v nárůstu hypertrofie, se zde neodehrává. Vzhledem ke snížené GSIS u *Nox4* silencovaných INS-1E buněk předpokládáme, že u mutantních myší nárůst glykémie (vlivem inzulinové rezistence v periférii navozené HFD) nemá na jejich tvorbu a výlev inzulinu významný vliv, a tedy neovlivňuje další hypertrofii LO (námi pozorovaný fenotyp). Účinky HFD a glukolipotoxicity jsou však komplexní a mohou zahrnovat dosud neznámé mechanismy a zasahovat do celkové fyziologie organismu.

Rozdíly architektury LO u čtyřtýdenních kontrolních a mutantních myší matek krmených normální (ND) a vysokotukovou (HFD) dietou

Abychom zjistili, jaký původ má zvýšená hypertrofie u mutantních myší na ND, analyzovali jsme pankreaty čtyřtýdenních myší (samice) matek, krmených po 8 týdnů HFD a ND. Tyto mladé myši byly

kojené mateřským mlékem, které je u myší bohaté na obsah tuku (Rörs et al., 2009) a s možností se přikrmovat přítomnou dietou od matky. Zajímalo nás, zda nalezneme u těchto mladých samic rozdíly ve velikosti LO podobné dospělým myším. To by znamenalo přímý vliv NOX4 a nikoliv vliv adaptačních dějů zapojených do funkční maturace β buněk při přechodu z mateřského mléka na tuhou stravu. Jak se ukázalo, zvýšenou hypertrofií LO u mutantních myší na ND proti kontrole na ND pozorujeme již u těchto mladých zvířat. Podobně jako je tomu u dospělých, procentuální zastoupení velkých LO ($> 5\,000\ \mu\text{m}^2$) u mutantních myší na ND (33 %, velikost mediánního LO $2647\ \mu\text{m}^2$) se pohybuje mezi hodnotami velkých LO u kontrolních myší na ND (22,33 %, velikost mediánního LO $2213\ \mu\text{m}^2$) a HFD (44 %, velikost mediánního LO $4094\ \mu\text{m}^2$). Nárůst hypertrofie u mladých kontrolních myší na HFD byl proti dospělým myším nižší, vzhledem k relativně krátké době jejich diety a plasticity mladého organismu, což je znát také na hodnotách velikosti mediánních LO. Zastoupení velkých LO u mladých mutantních myší na HFD bylo o něco nižší, než na ND (26,67 %, velikost mediánního LO $2135\ \mu\text{m}^2$).

Strava matky do značné míry ovlivňuje vývoj plodu, složení mateřského mléka a predispozice potomka. Studie vedené na myších krmených HFD prokázaly v mléce zvýšený obsah laktózy, tuků a přes 25 odlišných miRNA a 1500 mRNA u HFD krmených matek proti zdravé kontrole (Chen et al., 2017). Jak je vidět na velikosti LO u mladých myší, HFD u matek kontrolní skupiny vyvolalo nárůst ve velikosti LO, pravděpodobně díky zvýšenému obsahu tuků v mléce a možnému narušení správného vývoje. U mutantních myší neměla HFD negativní vliv a jejich slinivky měly nejnižší míru hypertrofie LO ze všech pozorovaných skupin.

Z našich výsledků usuzujeme, že delece NOX4 a změny v redoxním prostředí β buněk se mohou podílet na ovlivnění hypertrofie LO a úplném rozvratu správného hospodaření s glukózou v těle již během ontogeneze a časně po narození. Rozvoj hypertrofie u mutantních myší může být způsoben, např. již zmíněnou abnormální tvorbou proinzulinu a zvýšenou bazální sekrecí inzulinu, narušením parakrinních signalizací v LO s ostatními endokrinními buňkami α , δ , ϵ a PP, nebo (současně) absencí důležitého MCFs (H_2O_2) pro správný průběh přenosu signálu o metabolickém stavu organismu a β buňky. Z výsledků pokusu na čtyřtýdenních myších usuzujeme, že delece NOX4 ovlivňuje hyperplázii β buněk a hypertrofií LO již v mládí v období kojení a příležitostněm zařazení tuhé stravy. Hyperplázie LO u mutantních myší nemá s přibývajícím věkem zvyšující se charakter.

Vliv NOX4 na expresi glukagonu u INS-1E buněk

Glukagon pochází primárně z α buněk LO. I když působí antagonisticky vůči inzulinu, patří mezi hlavní parakrinní signál pro jeho sekreci (Kawai et al., 1995). Ve výjimečných případech ho mohou sekretovat také β buňky po jejich přeprogramování (White et al., 2013), ke které dochází během rozvoje diabetu. Vzhledem ke zvýšené bazální sekreci inzulinu u *Nox4* silencovaných buněk a změnám ve velikosti LO u mutantních myší, jsme se zaměřili na produkci glukagonu u INS-1E buněk. Pomocí

imunocytochemie jsme fluorescenčně označili glukagon a inzulin uvnitř INS-1E buněk a u všech pozorovaných skupin jsme zaznamenali přítomnost glukagon-pozitivních buněk (viz. obrázek číslo 9 až 11). Pro zjištění jejich reálného zastoupení a možných rozdílů v jejich počtu by bylo nutné zhotovit další přesnější analýzy, např. pomocí průtokové cytometrie změřit reálnou velikost této populace a pomocí vysoce senzitivní ELISA metody analyzovat obsah glukagonu. Při pozorování kultury na konfokálním mikroskopu jsme zaznamenali snížený počet glukagon pozitivních buněk u kontroly CTRL a zvýšený signál u glukagon pozitivních buněk u *Nox4* silencovaných buněk. Naše pozorování mohlo ovšem být zkresleno subjektivním smyslovým vnímáním. Rádi bychom tedy v budoucnu pokračovali ve studiu buněčné heterogenity a role NOX4 při práci s buňky LO mutantních myší cytometrickými metodami, které nám umožní získat přesnější výsledky. Na základě našich pozorování můžeme s jistotou tvrdit, že u všech skupin INS-1E β buněk se vyskytovaly skupiny β buněk sekretující současně glukagon a inzulin. Zvýšené množství bi-hormonálních buněk u NOX4 silencovaných INS-1E, bude předmětem další validace, vystihuje jejich narušenou inzulinovou expresi a porušenou GSIS.

9. Závěr

Produkce ROS v bezpečném množství ovlivňuje v β buňkách sekreci váčků s inzulinem a genovou expresi inzulinu a dalších proteinů. Vzhledem k rozličné časoprostorové tvorbě ROS v β buňkách, však dosud nebyl s jistotou identifikován žádný přesný zdroj ROS a jeho cílová molekula, který by byl zásadní pro správnou funkci zdravých β buněk. Jedním z kandidátních zdrojů je membránově vázaný enzym NOX4, který je spojen se schopností β buněk reagovat na glukózu výlevem inzulinu (Plecita-Hlavata et al., 2020). NOX4 je konstitutivně aktivní NADPH oxidáza, která produkuje signální molekulu H_2O_2 , která je zároveň nazývána MCF. H_2O_2 zásadně ovlivňuje blízké redoxně citlivé proteiny a díky odbourávání pomocí Prdx/Trx antioxidačního systému se zapojuje do přenosu signálu na delší, avšak lokální vzdálenosti (Stancill et al., 2019). Specifická delece NOX4 v β buňkách mutantních myší vede k narušení správné fyziologie celého organismu. Pozorujeme u nich poruchu GSIS, inzulinovou rezistenci a zmnožení tukové tkáně (Plecita-Hlavata et al., částečně nepublikováno). Změna v redoxním prostředí skrze deleci jednoho enzymu specificky v β buňkách se tak přímo odráží na fenotypu zvířete. Naším cílem bylo zjistit příčiny tohoto fenotypu a vlivu absence NOX4 na velikost LO a její závislosti na věku a stravě. Zmapovali jsme rozdíly u těchto mutantních a kontrolních myší, co se týče počtu LO, velikosti a jejich distribuce ve slinivce. Abychom zjistili více o molekulárních mechanismech zapojení NOX4, využili jsme buněčnou kulturu potkaních β buněk INS-1E. Ověřili jsme na ní teorii o vlivu glukózy na genovou expresi *Nox4* v β buňkách. Snížením hladiny NOX4 silencingem pomocí siRNA jsme narušili redoxní prostředí u těchto buněk a pozorovali v souvislosti s tím jejich schopnost tvorby proinzulinu, inzulinu, výlev inzulinu a hladinu transkripčních faktorů inzulinu *Pdx1*, *MafA* a enzymů sestřihu proinzulinu *Pc1*, *Pc2* a *Cpe*.

Naše výsledky ukázaly, že:

- Exprese *Nox4* v INS-1E β buňkách je ovlivněna hladinou glykémie. Akutní navýšení glykémie z 11 mM na 25 mM vede k nárůstu mRNA pro NOX4.
- Snížení exprese *Nox4* v INS-1E β buňce způsobuje nárůst koncentrace proinzulinu za bazálních i akutně zvýšených hladin glykémie.
- Snížení exprese *Nox4* má vliv na expresi základního transkripčního faktoru inzulinu *Pdx1*. Silencing *Nox4* vede ke zvýšení hladiny mRNA pro *Pdx1*.
- Snížení exprese *Nox4* nemá vliv na hladiny mRNA enzymů sestřihu inzulinu PC1, PC2 a CPE.
- U *Nox4* silencovaných INS-1E β buněk je zvýšen bazální výlev inzulinu při nízkých hladinách glykémie.
- GSIS u *Nox4* silencovaných buněk je nižší, než u kontrolních INS-1E buněk.
- INS-1E β buněčná linie má pozitivní signál na glukagon.

- Počet LO ve slinivce je vysoce individuální a mezi průměrným počtem Langerhansových ostrůvků u kontrolních a mutantních myší není žádný statisticky významný rozdíl. Neliší se významně ani zastoupení LO v jednotlivých anatomických částech slinivky hlava a ocas.
- Delece genu *Nox4* v β buňkách mutantních myší vede ke zvýšené hypertrofii Langerhansových ostrůvků u dospělých i čtyřtýdenních myší matek krmených normální dietou bohatou na sacharidy.
- U mutantních myší nevede vysokotuková dieta k navýšení velikosti LO, kterou pozorujeme u kontrolních myší.

Na základě těchto výsledků si dovoluujeme tvrdit, že snížení exprese *Nox4* v INS-1E β buňkách vede k poruše správné funkce β buněk. β buňky se sníženou hladinou mRNA pro NOX4 nejsou schopné adekvátně reagovat na akutně zvýšené hladiny glykémie a při bazálních neindukčních koncentracích glukózy sekretují zvýšené množství inzulinu. Stejně jako dříve popsané tzv. „extrémní β buňky“ mají zvýšenou hladinu proinzulinu a mRNA pro PDX1. Nadměrná proteosyntéza a potlačená sekrece inzulinu je u NOX4 β KO mutantních zvířat spojena s hyperplázií β buněk a s rozvojem hypertrofie LO. Zvýšenou hypertrofii pozorujeme u dospělých i mladých čtyřtýdenních myší, což vylučuje vliv funkční maturace β buněk. Zatímco diabetogenní vysokotuková dieta u kontrolních myší způsobuje rapidní nárůst hypertrofie LO, u mutantních zvířat se míra hypertrofie v závislosti na dietě nemění. Tento jev bude nutné podrobit dalšímu zkoumání. Jeho příčinou by mohlo být zapojení NOX4 do přenosu signálu o aktuálních potřebách organismu a snížení citlivosti β buňky k hladinám glykémie a autokrinního inzulinu.

10. Citovaná literatura

- Anvari, E., Wikström, P., Walum, E. & Welsh, N., 2015. The novel NADPH oxidase 4 inhibitor GLX351322 counteracts glucose intolerance in high-fat diet-treated C57BL/6 mice. *Free Radical Research*, Jul, Issue 49 (11), pp. 1308-1318.
- Appenzeller-Herzog, C. a další, 2010. Disulphide production by Ero1 α -PDI relay is rapid and effectively regulated. *The EMBO Journal*, 27 Aug, Issue 29, pp. 3318-3329.
- Araki, K. a další, 2016. Redox Sensitivities of Global Cellular Cysteine Residues under Reductive and Oxidative Stress. *Journal of Proteome Research*, Issue 15(8), pp. 2548-2559.
- Assimacopoulos-Jeannet, F. a další, 1997. Fatty Acids Rapidly Induce the Carnitine Palmitoyltransferase I Gene in the Pancreatic β -Cell Line INS-1. *Journal of biological chemistry*, Jan, Issue 272(3), pp. 1659-1664.
- Bae, Y. a další, 1997. Epidermal Growth Factor (EGF)-induced Generation of Hydrogen Peroxide. *Journal of biological chemistry*, Jan, Issue 272, pp. 217-221.
- Bánfi, B. a další, 2001. A Ca²⁺-activated NADPH Oxidase in Testis, Spleen, and Lymph Nodes. *The Journal of Biological Chemistry*, Aug, Issue 276 (40), pp. 37594-37601.
- Barlow, J. & Affourtit, C., 2013. Novel insights into pancreatic β -cell glucolipotoxicity from real-time functional analysis of mitochondrial energy metabolism in INS-1E insulinoma cells. *Biochemical Journal*, Nov, Issue 456(3), pp. 417-426.
- Bienert, G. a další, 2007. Specific aquaporins facilitate the diffusion of hydrogen peroxide across membranes. *Journal of Biological Chemistry*, Jan, Issue 282 (2), pp. 1183-1192.
- Biggs, W. a další, 1999. Protein kinase B/Akt-mediated phosphorylation promotes nuclear exclusion of the winged helix transcription factor FKHR1. *PNAS*, Jun, Issue 96 (13), pp. 7421-7426.
- Bihlmaier, K. a další, 2007. The disulfide relay system of mitochondria is connected to the respiratory chain. *Journal of Cell Biology*, Nov, Issue 179 (3), pp. 389-395.
- Biteau, B., Labarre, J. & Toledano, M., 2003. ATP-dependent reduction of cysteine-sulphinic acid by *S. cerevisiae* sulphiredoxin. *Nature*, Oct, Issue 425(6961).
- Block, K., Gorin, Y. & Abboud, H., 2009. Subcellular localization of Nox4 and regulation in diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, Aug, Issue 106(34), pp. 14385-14390.
- Boni-Schnetzler, M. a další, 2008. Increased Interleukin (IL)-1 β Messenger Ribonucleic Acid Expression in Beta -Cells of Individuals With Type 2 Diabetes and Regulation of IL-1 β in Human Islets by Glucose and Autostimulation. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, Oct, Issue 93 (10), pp. 4065-4074.
- Boschero, A., Tombaccini, D. & Atwater, I., 1988. Effects of glucose on insulin release and 86Rb permeability in cultured neonatal and adult rat islets.. *Febs press*, Aug, Issue 236(2), pp. 375-379.
- Brandes, R., Weissmann, N. & Schröder, K., 2014. Nox family NADPH oxidases: Molecular mechanisms of activation. *Free Radical Biology and Medicine*, November, pp. 208-226. *

- Brüning, J. a další, 1997. Development of a Novel Polygenic Model of NIDDM in Mice Heterozygous for IR and IRS-1 Null Alleles. *Cell*, Feb, Issue 88 (4), pp. 561-572.
- Cadenas, E. & Davies, K., 2000. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radical Biology and Medicine*, Aug, Issue 29(3-4), pp. 222-230. *
- Carlsson, C., Borg, L. & Welsh, N., 1999. Sodium Palmitate Induces Partial Mitochondrial Uncoupling and Reactive Oxygen Species in Rat Pancreatic Islets in Vitro. *Endocrinology*, 1 Aug, Issue 140 (8), pp. 3422-3428.
- Carvalho, C. a další, 2010. Beta Cell Coupling and Connexin Expression Change During the Functional Maturation of Rat Pancreatic Islets. *Diabetologia*, Jul, Issue 53(7), pp. 1428-1437.
- Cnop, M. a další, 2014. RNA Sequencing Identifies Dysregulation of the Human Pancreatic Islet Transcriptome by the Saturated Fatty Acid Palmitate. *Diabetes*, Jun, Issue 63 (6), pp. 1978-1993.
- Conrad, E., Stein, R. & Hunter, C., 2014. Revealing transcription factors during human pancreatic β cell development. *Trends Endocrinol Metab*, May, Issue 25(8), pp. 407-414. *
- Crutzen, R. a další, 2011. Does NAD(P)H oxidase-derived H₂O₂ participate in hypotonicity-induced insulin release by activating VRAC in β -cells?. *Signaling and Cell Physiology*, Nov, Issue 463 (2), pp. 377-390.
- Danaei, G. a další, 2011. National, regional, and global trends in fasting plasma glucose and diabetes prevalence since 1980: systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 370 country-years and 2·7 million participants. *The Lancet*, Jul, Issue 378 (9785), pp. 31-40.
- DaSilva-Xavier, G., Qian, Q., Cullen, P. & Rutter, G., 2004. Distinct roles for insulin and insulin-like growth factor-1 receptors in. *Biochemical Journal*, Jan, Issue 377 (1), pp. 149-158.
- Davidson, H. & Hutton, J., 1987. The insulin-secretory-granule carboxypeptidase H. Purification and demonstration of involvement in proinsulin processing. *Biochemical Journal*, Issue 245 (2), pp. 575-582.
- Davidson, H., Rhodes, C. & Hutton, J., 1988. Intraorganellar Calcium and pH Control Proinsulin Cleavage in the Pancreatic Beta Cell via Two Distinct Site-Specific Endopeptidases. *Nature*, May, Issue 333 (6168), pp. 93-96.
- Dean, P., 1973. Ultrastructural morphometry of the pancreatic β -cell. *Diabetologia*, Apr, Issue 9, pp. 115-119.
- Delaunay, A. a další, 2002. A Thiol Peroxidase Is an H₂O₂ Receptor and Redox-Transducer in Gene Activation. *Cell*, Nov, Issue 111 (4), pp. 471-481.
- Dillberger, J., 1994. Age-Related Pancreatic Islet Changes in Sprague-Dawley Rats. *Toxicologic Pathology*, Jan, pp. 48-55.
- Ding, Y. a další, 2010. Inhibition of Nox-4 Activity by Plumbagin, a Plant-Derived Bioactive Naphthoquinone. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, Feb, Issue 57 (1), pp. 111-116.

- Dorrell, C. a kol., 2016. Human islets contain four distinct subtypes of β cells. *Nature Communications*, 7, 11756.
- Dubois, M. a další, 2007. Glucotoxicity inhibits late steps of insulin exocytosis. *Endocrinology*, Apr, Issue 148(4), pp. 1605-1614.
- Dupuy, C. a další, 1999. Purification of a Novel Flavoprotein Involved in the Thyroid NADPH Oxidase. *The Journal of Biological Chemistry*, Dec, Issue 274, pp. 37265-37269.
- Elsner, M., Gehrman, W. & Lenzen, S., 2011. Peroxisome-Generated Hydrogen Peroxide as Important Mediator of Lipotoxicity in Insulin-Producing Cells. *Diabetes*, Jan, Issue 60 (1), pp. 200-208.
- Ehrie, M. a Swartz, F., 1974. Diploid, Tetraploid and Octaploid Beta Cells in the Islets of Langerhans of the Normal Human Pancreas. *Diabetes*, 23(7), 583-588.
- Essers, M. a další, 2004. FOXO Transcription Factor Activation by Oxidative Stress Mediated by the Small GTPase Ral and JNK. *EMBO Journal*, Dec, Issue 23 (24), pp. 4802-4812.
- Fantus, I., 2002. The pathogenesis of the chronic complications of the diabetes mellitus. *Endocrinology Rounds*, Issue 2, pp. 1-8.
- Farack, L. a další, 2019. Transcriptional Heterogeneity of Beta Cells in the Intact Pancreas. *Developmental Cell (Technology)*, Jan, Issue 48, pp. 115-125.
- Folli, F. a další, 2018. Pancreatic islet of langerhans' cytoarchitecture and ultrastructure in normal glucose tolerance and in type 2 diabetes mellitus. *Diabetes, obesity and metabolism*, Issue 20(2), pp. 137-144. *
- Fu, Y. a další, 2010. Regulation of NADPH oxidase activity is associated with miRNA-25-mediated NOX4 expression in experimental diabetic nephropathy. *American Journal of NEphrology*, Issue 32, pp. 581-589.
- Garlid, K. a další, 1996. On the Mechanism of Fatty Acid-Induced Proton Transport by Mitochondrial Uncoupling Protein. *Journal of Biological Chemistry*, Feb, Issue 271(5), pp. 2615-2620.
- Geiszt, M., Kopp, J., Várnai, P. & Leto, T., 2000. Identification of Renox, an NAD(P)H oxidase in kidney. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Jul, Issue 97(14), pp. 8010-8014.
- Geiszt, M. & Leto, T., 2004. The Nox Family of NAD(P)H Oxidases: Host Defense and Beyond. *Journal of biological chemistry*, Sep, Issue 279, pp. 51715-51718. *
- Giddings, S., Carnaghi, L. & Shalwitz, R., 1993. Hypoglycemia but Not Hyperglycemia Induces Rapid Changes in Pancreatic Beta-Cell Gene Transcription. *Amerivan Journal of Physiology*, Aug, Issue 265(2), pp. 259-266.
- Gorin, Y. a další, 2003. Nox4 mediates angiotensin II-induced activation of Akt/protein kinase B in mesangial cells. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*, Issue 285(2), pp. 219-229.

- Graciano, M., Valle, M., Curi, R. & Carpinelli, A., 2013. Evidence for the Involvement of GPR40 and NADPH Oxidase in Palmitic Acid-Induced Superoxide Production and Insulin Secretion. *Islets*, Aug, Issue 5 (4), pp. 139-148.
- Grankvist, K., Marklund, S. & Täljedal, I., 1981. CuZn-superoxide dismutase, Mn-superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in pancreatic islets and other tissues in the mouse. *Biochemical Journal*, 1 November, Issue 199(2), p. 393–398.
- Gremlich, S., Bonny, C., Waeber, G. & Thorens, B., 1997. Fatty Acids Decrease IDX-1 Expression in Rat Pancreatic Islets and Reduce GLUT2, Glucokinase, Insulin, and Somatostatin Levels. *Journal of Biological Chemistry*, 28 Nov, Issue 272 (48), pp. 30261-30269.
- Griendling, K., Minieri, C., Ollerenshaw, J. & Alexander, R., 1994. Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. *Circulation Research*, Jan, Issue 74, pp. 1141-1148.
- Griffith, O. & Meister, A., 1985. Origin and turnover of mitochondrial glutathione. *PNAS*, Jul, Issue 82 (14), pp. 4668-4672.
- Gylfe, E. & Hellman, B., 1975. The heat production of pancreatic beta-cells stimulated by glucose. *Acta Physiologica Scandinavica*, Feb, Issue 93 (2), pp. 179-183.
- Hainaut, P. & Milner, J., 1993. Redox Modulation of p53 Conformation and Sequence-Specific DNA Binding in Vitro. *Cancer Research*, Oct, Issue 53 (19), pp. 4469-4473.
- Harmon, J. a další, 2009. β -Cell-Specific Overexpression of Glutathione Peroxidase Preserves Intranuclear MafA and Reverses Diabetes in db/db Mice. *Endocrinology*, Nov, Issue 150(11), pp. 4855-4862.
- Harmon, J. a další, 1999. In vivo prevention of hyperglycemia also prevents glucotoxic effects on PDX-1 and insulin gene expression. *Diabetes*, Oct, pp. 1995-2000.
- Harmon, J., Stein, R. & Robertson, R., 2005. Oxidative Stress-mediated, Post-translational Loss of MafA Protein as a Contributing Mechanism to Loss of Insulin Gene Expression in Glucotoxic Beta Cells. *The Journal of Biological Chemistry*, Jan, Issue 280, pp. 11107-11113.
- Heimberg, H. a kol., 1996. Heterogeneity in glucose sensitivity among pancreatic β -cells is correlated to differences in glucose phosphorylation rather than glucose transport. *EMBO Journal*, 12(7), 2873-2879.
- Hellman, B., 1960. The Islets of Langerhans in the Rat During Pregnancy and Lactation, with Special Reference to the Changes in the B/A Cell Ratio. *Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica*, Jan, Issue 39, pp. 331-342.
- Hilenski, L. a další, 2003. Distinct Subcellular Localizations of Nox1 and Nox4 in Vascular Smooth Muscle Cells. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, Dec, Issue 24(4), pp. 677-683.
- Holeček, M., 2016. *Regulace metabolismu základních živin u člověka*. Praha: Karolinum.

- Chan, C. a další, 1999. Overexpression of uncoupling protein 2 inhibits glucose-stimulated insulin secretion from rat islets. *Diabetes*, Svazek 48(7), pp. 1482-1486.
- Cheng, Z. & White, M., 2012. kNOXing on the Door of Selective Insulin Resistance. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, May, Issue 32 (5), pp. 1063-1065.
- Chen, J. a další, 2008. Thioredoxin-interacting Protein: A Critical Link Between Glucose Toxicity and Beta-Cell Apoptosis. *Diabetes*, Apr, Issue 57 (4), pp. 938-944.
- Chen, Y. a další, 2017. Effect of high-fat diet on secreted milk transcriptome in midlactation mice. *Physiological Genomics*, Dec, Issue 49 (12), pp. 747-762.
- Chiu, J. a další, 2008. Oxidative Stress-Induced, poly(ADP-ribose) Polymerase-Dependent Upregulation of ET-1 Expression in Chronic Diabetic Complications. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, Jun, Issue 86 (6), pp. 365-372.
- In't-Veld, P. & Marichal, M., 2010. Microscopic anatomy of the human islet of Langerhans. V: *The Islets of Langerhans*. 654 editor Dordrecht: Springer, pp. 1-19.
- Ishii, T. a další, 2000. Transcription Factor Nrf2 Coordinately Regulates a Group of Oxidative Stress-inducible Genes in Macrophages. *The Journal of Biological Chemistry*, May, Issue 275, pp. 16023-16029.
- Itoh, K. a další, 1997. An Nrf2/Small Maf Heterodimer Mediates the Induction of Phase II Detoxifying Enzyme Genes through Antioxidant Response Elements. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Jul, Issue 236 (2), pp. 312-322.
- Jacovetti, C. a další, 2015. Postnatal β -cell maturation is associated with islet-specific microRNA changes induced by nutrient shifts at weaning. *Nature Communications*, Issue 6, p. 8084.
- Kalinina, E., Chernov, N. & Saprin, A., 2008. Involvement of Thio-, Peroxi-, and Glutaredoxins in Cellular Redox-Dependent Processes. *Biochemistry (Moscow)*, Dec, Issue 73 (13), pp. 1493-1510. *
- Kamp, F., Hamilton, J. & Westerhoff, H., 1993. Movement of Fatty Acids, Fatty Acid Analogues, and Bile Acids Across Phospholipid Bilayers. *Biochemistry*, Oct, Issue 32(41), pp. 11074-11086.
- Kaneto, H. a další, 1999. Beneficial effects of antioxidants in diabetes: possible protection of pancreatic beta-cells against glucose toxicity. *Diabetes*, Dec, Issue 48(12), pp. 2398-2406.
- Kaneto, H. a další, 2002. Involvement of c-jun n-terminal kinase in oxidative stress-mediated suppression of insulin gene expression. *The Journal of Biological Chemistry*, Aug, pp. 30010-30018.
- Karala, A., Lappi, A., Saaranen, M. & Ruddock, L., 2009. Efficient Peroxide-Mediated Oxidative Refolding of a Protein at Physiological pH and Implications for Oxidative Folding in the Endoplasmic Reticulum. *Antioxidants & Redox Signaling*, May, Issue 11(5), pp. 963-970.
- Kashio, M. & Tominaga, M., 2015. Redox Signal-mediated Enhancement of the Temperature Sensitivity of Transient Receptor Potential Melastatin 2 (TRPM2) Elevates Glucose-induced Insulin Secretion from Pancreatic Islets.. *Journal of Biological Chemistry*, May, Issue 290 (19), pp. 12435-12442.

- Katsuta, H. a kol., 2012. Subpopulations of GFP-Marked Mouse Pancreatic β -Cells Differ in Size, Granularity, and Insulin Secretion. *Endocrinology*, 153(11), 5170-5187.
- Katsuta, H. a kol., 2009. Single pancreatic beta cells co-express multiple islet hormone genes in mice. *Diabetologia*, 53(1), 128-138.
- Kawai, K. a další, 1995. Evidence that glucagon stimulates insulin secretion through its own receptor in rats. *Diabetologia*, Mar, Issue 38, pp. 274-276.
- Kikuchi, H., Hikage, M., Miyashita, H. & Fukumoto, M., 2000. NADPH oxidase subunit, gp91phox homologue, preferentially expressed in human colon epithelial cells. *Gene*, Aug, Issue 254(1-2), pp. 237-243.
- Kim, A. a další, 2010. Islet architecture - A comparative study. *Islets*, Jul, Issue 1(2), pp. 129-136.
- Kitamura, T. a další, 2002. The forkhead transcription factor Foxo1 links insulin signaling to Pdx1 regulation of pancreatic β cell growth. *Journal of Clinical Investigation*, Dec, Issue 110 (12), pp. 1839-1847.
- Klöppel, G. a další, 1985. Islet Pathology and the Pathogenesis of Type 1 and Type 2 Diabetes mellitus Revisited. *Metabolic and Endocrine Disorders*, Issue 4(1), pp. 110-125.
- Kobayashi, K. a další, 2000. The db/db mouse, a model for diabetic dyslipidemia: Molecular characterization and effects of western diet feeding. *Metabolism - Clinical and Experimental*, Jan, Issue 49 (1), pp. 22-31.
- Koga, H. a další, 1999. Tetratricopeptide repeat (TPR) motifs of p67phox participate in interaction with the small GTPase Rac and activation of the phagocyte NADPH oxidase. *Journal of Biological Chemistry*, Issue 274 (35), pp. 25051-25060.
- Kulkarni, R. a další, 1999. Tissue-Specific Knockout of the Insulin Receptor in Pancreatic β Cells Creates an Insulin Secretory Defect Similar to that in Type 2 Diabetes. *Cell*, Feb, Issue 96 (3), pp. 329-339.
- Kuroda, A. a další, 2009. Insulin Gene Expression Is Regulated by DNA Methylation. *PLOS One*, Issue 4 (9), p. e6953.
- Kwon, S. a další, 2003. H₂O₂ regulates cardiac myocyte phenotype via concentration-dependent activation of distinct kinase pathways. *Journal of molecular and cellular cardiology*, Jun, Issue 35(6), pp. 615-621.
- Lambeth, J., Kawahara, T. & Diebold, B., 2007. Regulation of Nox and Duox Enzymatic Activity and Expression. Apr, Issue 43 (3), pp. 319-331. *
- Lazarow, P. & DeDuve, C., 1976. A fatty acyl-CoA oxidizing system in rat liver peroxisomes; enhancement by clofibrate, a hypolipidemic drug. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Jun, Issue 73 (6), pp. 2043-2046.
- Lee, C. a další, 2002. Foxa2 Controls Pdx1 Gene Expression in Pancreatic Beta-Cells in Vivo. *Diabetes*, Aug, Issue 51 (8), pp. 2546-2551.

- Lenzen, A., Drinkgern, J. & Tiedge, M., 1996. Low Antioxidant Enzyme Gene Expression in Pancreatic Islets Compared With Various Other Mouse Tissues. *Free Radical Biology and Medicine*, Issue 20(3), pp. 463-466.
- Lenzen, S., 2017. Chemistry and biology of reactive species with special reference to the antioxidative defence status in pancreatic beta cells. *BBA-General Subjects*, Issue 1861, pp. 1929-1942. *
- Lewin, T., VanHorn, C., Krisans, S. & Coleman, R., 2002. Rat liver acyl-CoA synthetase 4 is a peripheral-membrane protein located in two distinct subcellular organelles, peroxisomes, and mitochondrial-associated membrane. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, Issue 404, pp. 263-270.
- Li, J. a další, 2006. The NADPH Oxidase NOX4 Drives Cardiac Differentiation: Role in Regulating Cardiac Transcription Factors and MAP Kinase Activation. *Molecular biology of the cell*, Sep, Issue 17(9), pp. 3978-3988.
- Li, N. a další, 2012. NADPH Oxidase NOX2 Defines a New Antagonistic Role for Reactive Oxygen Species and cAMP/PKA in the Regulation of Insulin Secretion. *Diabetes*, Nov, Issue 61(11), pp. 2842-2850.
- Lin, N., Chen, H., Zhang, H. & Wan, X. S. Q., 2012. Mitochondrial Reactive Oxygen Species (ROS) Inhibition Ameliorates Palmitate-Induced INS-1 Beta Cell Death. *Endocrine*, Aug, Issue 42 (1), pp. 107-117.
- Lin, S. a další, 2004. Adenovirus-mediated overexpression of catalase attenuates oxLDL-induced apoptosis in human aortic endothelial cells via AP-1 and C-Jun N-terminal kinase/extracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinase pathways. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, Jan, Issue 36(1), pp. 129-139.
- Liu, Y., Tornheim, K. & Leahy, J., 1998. Fatty Acid-Induced Beta Cell Hypersensitivity to Glucose. Increased Phosphofructokinase Activity and Lowered glucose-6-phosphate Content. *Journal of Clinical Investigation*, May, Issue 101(9), pp. 1870-1875.
- Llanos, P. a další, 2015. Glucose-Dependent Insulin Secretion in Pancreatic β -Cell Islets from Male Rats Requires Ca^{2+} Release via ROS-Stimulated Ryanodine Receptors. *PLOS One*, Jun, Issue 10 (10), p. e0140198.
- Lo, Y. & Cruz, T., 1995. Involvement of Reactive Oxygen Species in Cytokine and Growth Factor Induction of c-fos Expression in Chondrocytes. *Journal of biological chemistry*, May, Issue 270, pp. 11727-11730.
- Lundquist, I. & Ericson, L., 1978. Beta-adrenergic insulin release and adrenergic innervation of mouse pancreatic islets. *Cell and Tissue Research*, october, Issue 193(1), pp. 73-85.
- Luo, X., Wu, J., Jing, S. & Yan, L., 2016. Hyperglycemic Stress and Carbon Stress in Diabetic Glucotoxicity. *Aging and disease*, jan, Issue 7 (1), pp. 90-110. *
- MacDonald, P., Salapatek, A. & Wheeler, M., 2003. Temperature and Redox State Dependence of Native Kv2.1 Currents in Rat Pancreatic Beta-Cells. *Journal of Physiology*, Feb, Issue 546 (3), pp. 647-653.

- Mahadev, K. a další, 2004. The NAD(P)H Oxidase Homolog Nox4 Modulates Insulin-Stimulated Generation of H₂O₂ and Plays an Integral Role in Insulin Signal Transduction. *Molecular and Cellular Biology*, Feb, Issue 24(5), pp. 1844-1854.
- Marhfour, I. a další, 2009. Impact of Sur1 gene inactivation on the morphology of mouse pancreatic endocrine tissue. *Cell and Tissue Research*, Mar, Issue 335(3), pp. 505-515.
- Marshak, S. a další, 2000. Functional Conservation of Regulatory Elements in the pdx-1 Gene: PDX-1 and Hepatocyte Nuclear Factor 3 β Transcription Factors Mediate β -Cell-Specific Expression. *Molecular and Cellular Biology*, Oct, Issue 20 (20), pp. 7583-7590.
- Martyn, K. a další, 2006. Functional Analysis of Nox4 Reveals Unique Characteristics Compared to Other NADPH Oxidases. *Cellular Signalling*, Jan, Issue 18 (1), pp. 69-82.
- Matschinsky, F., 1990. Glucokinase as Glucose Sensor and Metabolic Signal Generator in Pancreatic Beta-Cells and Hepatocytes. *Diabetes*, Jun, Issue 39 (6), pp. 647-652. *
- McGarry, J. & Foster, D., 1979. In Support of the Roles of malonyl-CoA and Carnitine Acyltransferase I in the Regulation of Hepatic Fatty Acid Oxidation and Ketogenesis. *Journal of Biological Chemistry*, Sep, Issue 254(17), pp. 8163-8168.
- McMahon, M., Itoh, K., Yamamoto, M. & Hayes, J., 2003. Keap1-dependent Proteasomal Degradation of Transcription Factor Nrf2 Contributes to the Negative Regulation of Antioxidant Response Element-driven Gene Expression. *The Journal of Biological Chemistry*, 7 Apr, Issue 278, pp. 21592-21600.
- Mehmeti, I., Lortz, S., Elsner, M. & Lenzen, S., 2014. Peroxiredoxin 4 Improves Insulin Biosynthesis and Glucose-induced Insulin Secretion in Insulin-secreting INS-1E Cells. *Journal of biological chemistry*, Aug, Issue 289, pp. 26904-26913.
- Meier, B. a další, 1989. Human fibroblasts release reactive oxygen species in response to interleukin-1 or tumour necrosis factor- α . *Biochemical Journal*, Oct, Issue 263(2), pp. 539-545.
- Melloul, D., Marshak, S. & Cerasi, E., 2002. Regulation of insulin gene transcription. *Diabetologia*, Apr, Issue 45, pp. 309-326. *
- Melo, E. a další, 2017. TriPer, an optical probe tuned to the endoplasmic reticulum tracks changes in luminal H₂O₂. *BMC Biology*, Mar, Issue 15(1), p. 24.
- Mense, M. & Rosol, T., 2018. Endocrine Pancreas. V: *Boorman's Pathology of the Rat*. 2 editor místo neznámé: Elsevier Books, pp. 695-704.
- Merglen, A. a další, 2004. Glucose Sensitivity and Metabolism-Secretion Coupling Studied during Two-Year Continuous Culture in INS-1E Insulinoma Cells. *Endocrinology*, Feb, Issue 145 (2), pp. 667-678.
- Mishina, N. a další, 2011. Does Cellular Hydrogen Peroxide Diffuse or Act Locally?. *Antioxidants & Redox Signaling*, Jan, Issue 14(1), pp. 1-7.

- Morgan, D. a další, 2006. Glucose, palmitate and pro-inflammatory cytokines modulate production and activity of a phagocyte-like NADPH oxidase in rat pancreatic islets and a clonal beta cell line. *Diabetologia*, Dec, Issue 50, pp. 359-369.
- Morgan, D. a další, 2009. Association of NAD(P)H Oxidase with Glucose-Induced Insulin Secretion by Pancreatic β -Cells. *Endocrinology*, May, Issue 150(5), pp. 2197-2201.
- Munhoz, A. a další, 2016. Control of Insulin Secretion by Production of Reactive Oxygen Species: Study Performed in Pancreatic Islets from Fed and 48-Hour Fasted Wistar Rats. *PLOS One*, Jun, Issue 11(6), p. e0158166.
- Nagamatsu, S. a další, 1999. Decreased expression of t-SNARE, syntaxin 1, and SNAP-25 in pancreatic beta-cells is involved in impaired insulin secretion from diabetic GK rat islets: restoration of decreased t-SNARE proteins improves impaired insulin secretion. *Diabetes*, Dec, Issue 48(12), pp. 2367-2373.
- NCBI, 2020. *Nox1 NADPH oxidase 1 [Rattus norvegicus (Norway rat)]*. [Online] Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/114243> [Přístup získán Apr 2020].
- NCBI, 2020. *Nox4 NADPH oxidase 4 [Rattus norvegicus (Norway rat)]*. [Online] Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/85431> [Přístup získán Apr 2020].
- Newshome, P. a další, 2009. Insights into the critical role of NADPH oxidase(s) in the normal and dysregulated pancreatic beta cell. *Diabetologia*, 7 11, Issue 52(12), pp. 2489-2498. *
- Nguyen, V. a další, 2011. Two Endoplasmic Reticulum PDI Peroxidases Increase the Efficiency of the Use of Peroxide during Disulfide Bond Formation. *Journal of Molecular Biology*, Issue 406, pp. 503-515.
- Ohba, M., Shibamura, M., Kuroki, T. & Nose, K., 1994. Production of hydrogen peroxide by transforming growth factor-beta 1 and its involvement in induction of egr-1 in mouse osteoblastic cells. *Journal of Cell Biology*, Aug, Issue 126 (4), pp. 1079-1088.
- Oligvie, R., 1933. The islands of langerhans in 19 cases of obesity. *The Journal of Pathology and Bacteriology*, Issue 37 (3), pp. 616-656.
- Oliveira, H., Curi, R. & Carpinelli, A., 1999. Glucose Induces an Acute Increase of Superoxide Dismutase Activity in Incubated Rat Pancreatic Islets. *American Journal of Physiology*, Feb, Issue 276 (2), pp. C507-510.
- Oliveira, H. a další, 2003. Pancreatic β -Cells Express Phagocyte-Like NAD(P)H Oxidase. *Diabetes*, Jun, Issue 52(6), pp. 1457-1463.
- Olson, L. a další, 1995. Reduction of insulin gene transcription in HIT-T15 beta cells chronically exposed to a supraphysiologic glucose concentration is associated with loss of STF-1 transcription factor expression. *PNAS*, Sep, pp. 9127-9131.

- Oquendo, M. a další, 2018. Energy depletion and not ROS formation is a crucial step of glucolipotoxicity (GLTx) in pancreatic beta cells. *European Journal of Physiology*, Mar, Issue 470(3), pp. 537-547.
- Orci, L. a další, 1987. Proteolytic maturation of insulin is a post-golgi event which occurs in acidifying clathrin-coated secretory vesicles. *Cell*, Jun, Issue 49, pp. 865-868.
- Ostenson, C. a další, 2006. Impaired Gene and Protein Expression of Exocytotic Soluble N-Ethylmaleimide Attachment Protein Receptor Complex Proteins in Pancreatic Islets of Type 2 Diabetic Patients. *Diabetes*, Feb, Issue 55(2), pp. 435-440.
- Paffenholz, R. a další, 2004. Vestibular defects in head-tilt mice result from mutations in Nox3, encoding an NADPH oxidase. *Genes&Development*, Issue 18(5), pp. 486-491.
- Pandolfi, P. a další, 1995. Targeted disruption of the housekeeping gene encoding glucose 6-phosphate dehydrogenase (G6PD): G6PD is dispensable for pentose synthesis but essential for defense against oxidative stress. *EMBO J*, Nov, Issue 14 (21), pp. 5209-5215.
- Patterson, G. a další, 2000. Separation of the glucose-stimulated cytoplasmic and mitochondrial NAD(P)H responses in pancreatic islet β cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, May, Issue 97(10), pp. 5203-5207.
- Pendyala, S. a další, 2009. Role of Nox4 and Nox2 in Hyperoxia-Induced Reactive Oxygen Species Generation and Migration of Human Lung Endothelial Cells. *Antioxidants & Redox Signaling*, Apr, Issue 11(4), pp. 747-764.
- Pi, J. a další, 2007. Reactive Oxygen Species as a Signal in Glucose-Stimulated Insulin Secretion. *Diabetes*, Jul, 56(7), pp. 1783-1791.
- Plecita-Hlavata, L. a další, 2020. Glucose-Stimulated Insulin Secretion Fundamentally Requires H₂O₂ Signaling by NADPH Oxidase 4. *Diabetes*, Apr, Issue 69 (5), p. db191130.
- Rebelato, E. a další, 2018. Short-term high glucose culture potentiates pancreatic beta cell function. *Scientific reports*, Aug, Issue 8, p. 13061.
- Rhee, S., Woo, H., Kil, I. & Bae, S., 2012. Peroxiredoxin Functions as a Peroxidase and a Regulator and Sensor of Local Peroxides. *Journal of biological chemistry*, Feb, Issue 287 (7), pp. 4403-4410.
- Robertson, R., 2004. Chronic Oxidative Stress as a Central Mechanism for Glucose Toxicity in Pancreatic Islet Beta Cells in Diabetes. *Journal of biological chemistry*, Jul, pp. 42351-42354. *
- Robertson, R., Zhang, H., Pyzdrowski, K. & Walseth, T., 1992. Preservation of insulin mRNA levels and insulin secretion in HIT cells by avoidance of chronic exposure to high glucose concentrations. *Journal of Clinical Investigation*, Aug, pp. 320-325.
- Roder, M., Porte, D., Schwartz, R. & Kahn, S., 1998. Disproportionately Elevated Proinsulin Levels Reflect the Degree of Impaired B Cell Secretory Capacity in Patients with Noninsulin-Dependent Diabetes Mellitus. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, Feb, Issue 83 (2), pp. 604-608.

- Rodriguez-Diaz, R., Abdulreda, M., Formoso, A. & al., e., 2011. Innervation patterns of autonomic axons in the human endocrine pancreas. *Cell metabolism*, 6 july, Issue 14(1), pp. 45-54.
- Roma, L. & Jonas, J., 2019. Nutrient metabolism, subcellular redox state and oxidative stress in pancreatic islets and beta-cells. *Journal of molecular biology*, 18 October, Issue S0022-2836(19), pp. 30608-4.
- Rörs, S. a další, 2009. Technical note: Milk composition in mice—Methodological aspects and effects of mouse strain and lactation day. *Journal of Dairy Science*, Feb, Issue 92 (2), pp. 632-637.
- Roscioni, S., Migliorini, A., Gegg, M. & Lickert, H., 2016. Impact of islet architecture on β -cell heterogeneity, plasticity and function. *Nature Reviews, Endocrinology*, 12(12), 695-709.
- Sakai, K. a další, 2003. Mitochondrial Reactive Oxygen Species Reduce Insulin Secretion by Pancreatic Beta-Cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 3 jan, Issue 300 (1), pp. 216-222.
- Sakuraba, H. a další, 2002. Reduced beta-cell mass and expression of oxidative stress-related DNA damage in the islet of Japanese Type II diabetic patients. *Diabetologia*, January, pp. 85-96.
- Salomon, D. & Meda, P., 1986. Heterogeneity and contact-dependent regulation of hormone secretion by individual B cells. *Experimental Cell Research*, February, Issue 163(2), pp. 507-520.
- Sánchez-Andrés, J., Gomis, A. & Valdeolmillos, M., 1995. The electrical activity of mouse pancreatic beta-cells recorded in vivo shows glucose-dependent oscillations. *Journal of Physiology*, Issue 486.1, pp. 223-228.
- Santos, L. a další, 2017. NNT Reverse Mode of Operation Mediates Glucose Control of Mitochondrial NADPH and Glutathione Redox State in Mouse Pancreatic β -Cells. *Molecular Metabolism*, Jun, Issue 6 (6), pp. 535-547.
- Sedeek, M. a další, 2010. Critical role of Nox4-based NADPH oxidase in glucose-induced oxidative stress in the kidney: implications in type 2 diabetic nephropathy. *American Journal of Physiology, Renal Physiology*, Dec, Issue 299(6), pp. 1348-1358.
- Sekine, N. a další, 1994. Low Lactate Dehydrogenase and High Mitochondrial Glycerol Phosphate Dehydrogenase in Pancreatic Beta-Cells. Potential Role in Nutrient Sensing. *Journal of Biological Chemistry*, Feb, Issue 269 (7), pp. 4895-4902.
- Sharma, A. a další, 1995. The role of the insulin control element and RIPE3b1 activators in glucose-stimulated transcription of the insulin gene. *Molecular Endocrinology*, Nov, Issue 9(11), pp. 1468-1476.
- Sharma, A., Olson, L., Robertson, R. & Stein, R., 1995. The reduction of insulin gene transcription in HIT-T15 beta cells chronically exposed to high glucose concentration is associated with the loss of RIPE3b1 and STF-1 transcription factor expression. *Molecular Endocrinology*, Sep, pp. 1127-1134.
- Shiose, A. a další, 2001. A Novel Superoxide-Producing NAD(P)H Oxidase in Kidney. *Journal of Biological Chemistry*, Jan, Issue 276 (2), pp. 1417-1423.

- Shuster, L. a další, 1988. Incretin Effect Due to Increased Secretion and Decreased Clearance of Insulin in Normal Humans. *Diabetes*, Feb, Issue 37(2), pp. 200-203.
- Schreck, R. & Baeuerle, P., 1991. A role for oxygen radicals as second messengers. *Trends in Cell Biology*, Aug-Sep, Issue 1(2-3), pp. 39-42.
- Schuit, F., Kiekens, R. & Pipeleers, D., 1991. Measuring the balance between insulin synthesis and insulin release. *Biochemical and biophysical research communications*, Aug, Issue 178 (3), pp. 1182-1187.
- SIB, S. I. o. B., 2019. *Cellosaurus INS-1E (CVCL_0351)*. [Online] Available at: https://web.expasy.org/cellosaurus/CVCL_0351
- Song, M. a další, 2009. Sulforaphane Protects Against Cytokine- And Streptozotocin-Induced Beta-Cell Damage by Suppressing the NF-kappaB Pathway. *Toxicology and Applied Pharmacology*, Feb, Issue 235(1), pp. 57-67.
- Souza, A. a další, 2017. NADPH oxidase-2 does not contribute to b-cell glucotoxicity in cultured pancreatic islets from C57BL/6J mice. *Molecular and Cellular Endocrinology*, Jan, Issue 439, pp. 354-362.
- Stancill, J. a další, 2019. Pancreatic β -cells detoxify H₂O₂ through the peroxiredoxin/thioredoxin antioxidant system. *The Journal of Biological Chemistry*, Jan, Issue 294, pp. 4843-4853.
- Stefan, Y. a další, 1982. Quantification of endocrine cell content in the pancreas of nondiabetic and diabetic humans. *Diabetes*, Aug, pp. 694-700.
- Steinkamp-Fenske, K. a další, 2007. Reciprocal Regulation of Endothelial Nitric-Oxide Synthase and NADPH Oxidase by Betulinic Acid in Human Endothelial Cells. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, Aug, Issue 322 (2), pp. 836-842.
- Stolovich-Rain, M. a další, 2015. Weaning Triggers a Maturation Step of Pancreatic β Cells. *Developmental Cell*, Mar, Issue 32(5), pp. 535-545.
- Suh, Y. a další, 1999. Cell transformation by the superoxide-generating oxidase Mox1. *Nature*, Sep, Issue 401, pp. 79-82.
- Sundaresan, M. a další, 1995. Requirement for Generation of H₂O₂ for Platelet-Derived Growth Factor Signal Transduction. *Science*, Oct, Issue 270(5234), pp. 296-299.
- Tanaka, Y. a další, 1999. Prevention of glucose toxicity in HIT-T15 cells and Zucker diabetic fatty rats by antioxidants. *Proc Natl Acad Sci USA*, Sep, Issue 96(19), pp. 10857-10862.
- Tan, C., Tuch, B., Tu, J. & Brown, S., 2002. Role of NADH Shuttles in Glucose-Induced Insulin Secretion From Fetal β -Cells. *Diabetes*, Act, Issue 51(10), pp. 2989-2996.
- Tavender, T., Sheppard, A. & Bulleid, N., 2008. Peroxiredoxin IV is an endoplasmic reticulum-localized enzyme forming oligomeric complexes in human cells. *Biochemical Journal*, 1 Apr, Issue 411 (1), pp. 191-199.

- Tiedge, M., Lortz, S., Drinkgern, J. & Lenzen, S., 1997. Relation Between Antioxidant Enzyme Gene Expression and Antioxidative Defense Status of Insulin-Producing Cells. *Diabetes*, Nov, Issue 46 (11), pp. 1733-1742.
- Tillmar, L., Carlsson, C. & Welsh, N., 2001. Control of Insulin mRNA Stability in Rat Pancreatic Islets - Regulatory role of a 3'-untranslated region pyrimidine-rich sequence. *The Journal of Biological Chemistry*, Nov, Issue 277, pp. 1099-1106.
- Timblin, C., Janssen, Y. & Mossman, B., 1995. Transcriptional activation of the proto-oncogene c-jun by asbestos and H₂O₂ is directly related to increased proliferation and transformation of tracheal epithelial cells. *Cancer Research*, Jul, Issue 55(13), pp. 2723-2726.
- Tu, B. & Weissman, J., 2002. The FAD- and O₂-Dependent Reaction Cycle of Ero1-Mediated Oxidative Protein Folding in the Endoplasmic Reticulum. *Molecular Cell*, Nov, Issue 10(5), pp. 983-994.
- Uchizono, Y. a další, 2006. Expression of isoforms of NADPH oxidase components in rat pancreatic islets. *Life Sciences*, Dec, Issue 80 (2), pp. 133-139.
- Valle, M. a další, 2011. Alterations of NADPH Oxidase Activity in Rat Pancreatic Islets Induced by a High-Fat Diet. *Pancreas*, Apr, Issue 40(3), pp. 390-395.
- Vasa-Nicotera, M. a další, 2011. miR-146a is modulated in human endothelial cell with aging. *Atherosclerosis*, Aug, Issue 217 (2), pp. 326-330.
- Wang, D. a další, 1996. NADPH-oxidase and a hydrogen peroxide-sensitive K⁺ channel may function as an oxygen sensor complex in airway chemoreceptors and small cell lung carcinoma cell lines. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Nov, Issue 93(23), pp. 13182-13187.
- Wang, X. a další, 2018. The novel NADPH oxidase 4 selective inhibitor GLX7013114 counteracts human islet cell death in vitro. *PLOS One*, Sep, Issue 13 (9), p. e0204271.
- Wang, X. a další, 2013. Regional Differences in Islet Distribution in the Human Pancreas - Preferential Beta-Cell Loss in the Head Region in Patients with Type 2 Diabetes. *PLoS One*, Jun, Issue 8(6), p. e67454.
- Wang, Y. a kol., 2016. Single-Cell Transcriptomics of the Human Endocrine Pancreas. *Diabetes*, 65(10), 3028-3038.
- Wasserman, W. & Fahl, W., 1997. Functional Antioxidant Responsive Elements. *PNAS*, 13 May, Issue 94(10), pp. 5361-5366.
- Wheeler, M. a další, 1993. Functional Expression of the Rat Glucagon-Like peptide-I Receptor, Evidence for Coupling to Both Adenylyl Cyclase and phospholipase-C. *Endocrinology*, Jul, Issue 133 (1), pp. 57-62.
- White, M. a další, 2013. Expression of Mesenchymal and α -Cell Phenotypic Markers in Islet β -Cells in Recently Diagnosed Diabetes. *Diabetes Care*, Nov, Issue 36 (11), pp. 3818-3820.

WHO, 2016. *Diabetes country profiles*. [Online]

Available at: https://www.who.int/diabetes/country-profiles/cze_en.pdf?ua=1

[Přístup získán 13 8 2019].

WHO, 2018. *Diabetes*. [Online]

Available at: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/diabetes>

[Přístup získán 13 8 2019].

Wicksteed, B. a další, 2003. Glucose-induced Translational Control of Proinsulin Biosynthesis Is Proportional to Preproinsulin mRNA Levels in Islet β -Cells but Not Regulated via a Positive Feedback of Secreted Insulin. *Journal of Biological Chemistry*, Oct, Issue 278 (43), pp. 42080-42090.

Wikstrom, J. a kol., 2007. β -Cell Mitochondria Exhibit Membrane Potential Heterogeneity That Can Be Altered by Stimulatory or Toxic Fuel Levels. *Diabetes*, 56(10), 2569-2578.

Wu, J. a další, 2017. Pancreatic Mitochondrial Complex I Exhibits Aberrant Hyperactivity in Diabetes. *Biochemistry and Biophysics Reports*, Sep, Issue 11, pp. 119-129.

Xu, G., Chen, J., Jing, G. & Shalev, A., 2013. Thioredoxin-interacting protein regulates insulin transcription through microRNA-204. *Nature Medicine*, Aug, Issue 19, pp. 1141-1146.

Yoboue, E., Sitia, R. & Simmen, T., 2018. Redox crosstalk at endoplasmic reticulum (ER) membrane contact sites (MCS) uses toxic waste to deliver messages. *Cell Death & Disease*, 28 Feb, Issue 9 (331), pp. 1-14.

Yoshihara, E. a další, 2016. ERR γ Is Required for the Metabolic Maturation of Therapeutically Functional Glucose-Responsive β Cells. *Cell Metabolism*, Apr, Issue 23(4), pp. 622-634.

Zhang, P. a další, 2015. Induction of the ChREBP β Isoform Is Essential for Glucose-Stimulated Beta-cell Proliferation. *Diabetes*, Dec, Issue 64, pp. 4158-4170.

Zhank, Z. a další, 2010. High Glucose Inhibits glucose-6-phosphate Dehydrogenase, Leading to Increased Oxidative Stress and Beta-Cell Apoptosis. *The FASEB Journal*, May, Issue 24(5), pp. 1497-1505.

Zhou, Y. & Grill, V., 1994. Long-term exposure of rat pancreatic islets to fatty acids inhibits glucose-induced insulin secretion and biosynthesis through a glucose fatty acid cycle. *The Journal of Clinical Investigation*, Feb, Issue 93(2), pp. 870-876.

Zhou, Y. & Grill, V., 1995. Palmitate-Induced β -Cell Insensitivity to Glucose is Coupled to Decreased Pyruvate Dehydrogenase Activity and Enhanced Kinase Activity in Rat Pancreatic Islets. *Diabetes*, Apr, Issue 44(4), pp. 394-399.